

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicině

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Lenka Bělinová

Název závěrečné práce

Inzulínová rezistence a postprandiální stav u diabetu 2. typu.

Vliv frekvence a složení jídel na metabolismus glukózy a další projevy metabolického syndromu.

Title

Insulin resistance and postprandial state in type 2 diabetes. The effect of meal frequency and composition on glucose metabolism and other manifestations of metabolic syndrome.

Typ závěrečné práce

Disertační

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:

prof. MUDr. Terezie Pelikánová, DrSc.

Centrum diabetologie IKEM, Vídeňská 1958/9, 140 21, Praha 4,

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, dne 28. 4. 2017

MUDr. LENKA BĚLINOVÁ

Podpis:

Identifikační záznam:

BĚLINOVÁ, Lenka. *Inzulínová rezistence a postprandiální stav u diabetu 2. typu. Vliv frekvence a složení jídel na metabolismus glukózy a další projevy metabolického syndromu (Insulin resistance and postprandial state in type 2 diabetes. The effect of meal frequency and composition on glucose metabolism and other manifestations of metabolic syndrome)*. Praha, 2017. Počet stran: 86, počet příloh: 6. Typ závěrečné práce: disertační. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, 1. LF UK 2017. Vedoucí závěrečné práce/Školitel: prof. MUDr. Terezie Pelikánová, DrSc., Centrum diabetologie IKEM.

Poděkování

Moje největší poděkování patří mým rodičům. Za jejich podporu a pomoc, o kterou si nebylo třeba nikdy říkat. Dále chci poděkovat svým nejbližším MUDr. Filipovi Thieme a synkovi Jakoubkovi.

Ráda bych poděkovala svým kolegům a kolegyním, kteří se na realizaci studií spolupodíleli, hlavně MUDr. Haně Kahleové, Ph.D, MUDr. Kateřině Velebové, MUDr. Jiřímu Velebovi, Ing. Martinu Hillovi a sestrám v Laboratoři klinické patofyziologie Daně Kobrové, Danuši Lapešové a Dáše Šišákové.

Moje upřímné a srdečné poděkování patří mé školitelce paní profesorce MUDr. Terezii Pelikánové, DrSc. Nejen za její cenné rady a připomínky při práci na projektech i na oddělení, ale hlavně za její lidský přístup a nadhled.

Jednotlivé studie byly podpořeny grantem IGA MZČR NT/14250-3, dále MZČR (podporou rozvoje výzkumných organizací 00023001 IKEM, Praha, ČR) a Grantovou agenturou Univerzity Karlovy - GAUK – číslo projektu 702312.

Obsah:

ABSTRAKT A KLÍČOVÁ SLOVA	9
ABSTRACT AND KEY WORDS	11
I. ÚVOD DO DISERTAČNÍ PRÁCE A PŘEHLED LITERATURY K JEJÍ PROBLEMATICE	12
1. Inzulínová rezistence	13
1.1. Játra	13
1.2. Kosterní sval	14
1.3. Tuková tkáň	14
1.4. β -buňky Langerhansových ostrůvků	14
1.5. α -buňky Langerhansových ostrůvků	14
1.6. Endotel	15
1.7. Další tkáně a buňky	15
2. Postprandiální stav	16
2.1. Postprandiální stav u diabetu 2. typu	17
2.2. Postprandiální oxidační stres	18
2.3. Prandiální sekrece inzulínu	20
2.4. Vliv ostatních makronutrientů na postprandiální glykémii	21
2.5. Gastrointestinální a chuťové hormony	22
3. Frekvence jídel	25
II. NAŠE VÝZKUMNÁ PRÁCE	27
1. Hypotézy a cíle	27
1.1. Studie A: Vliv akutního podání tří jídel se stejným obsahem energie a různým složením na sekreci inzulínu a střevních hormonů u pacientů s diabetem 2. typu a u zdravých osob.	
1.2. Studie B: Vliv frekvence jídel na inzulínovou rezistenci, sekreci inzulínu a střevních hormonů a jaterní steatózu u pacientů s diabetem 2. typu.	
2. Studie A: Vliv akutního podání tří jídel se stejným obsahem energie a různým složením na sekreci inzulínu a střevních hormonů u pacientů s diabetem 2. typu a u zdravých osob. (Přílohy 1 a 2)	
2.1. Metodika	29
2.1.1. Design studie a soubor účastníků	29
2.1.2. Průběh studie	30
2.1.3. Analytické metody	32
2.1.4. Statistická analýza	33
2.2. Výsledky	33

2.2.1. Metabolická odpověď (sérové koncentrace glukózy, triglyceridů, volných mastných kyselin a ukazatele sekrece inzulínu (imunoreaktivní inzulín a c-peptid)	33
2.2.2. Gastrointestinální hormony	34
2.2.3. Chuťové hormony	34
2.2.4. Markery oxidačního stresu.....	34
2.2.6. Korelace.....	35
2.3. Diskuse	45
3. Studie B: Vliv frekvence jídel na inzulínovou rezistenci, sekreci inzulínu a střevních hormonů a jaterní steatózu u pacientů s diabetem 2. typu. (Přílohy 3-6)	
3.1. Metodika	49
3.1.1. Design studie a soubor účastníků	49
3.1.2. Průběh studie	49
3.1.3. Analytické metody	52
3.1.4. Statistická analýza	52
3.2. Výsledky	53
3.2.1. Tělesná hmotnost a BMI	53
3.2.2. Obsah tuku v játrech	53
3.2.3. Kompenzace diabetu	53
3.2.4. Inzulínová rezistence	53
3.2.5. Sekrece inzulínu	54
3.2.6. Klidový energetický výdej	54
3.2.7. Markery oxidačního stresu	54
3.2.8. Ostatní parametry	55
3.2.9. Chuťové hormony	57
3.2.10. Gastrointestinální hormony	57
3.2.11. Kvalita života, Beckovo skóre deprese, pocity hladu, disinhbice a pocity dietní restriktce	60
3.2.12. Složení mastných kyselin ve fosfolipidech séra	60
3.3. Diskuse	61
4. Souhrn hlavních výsledků	70
5. Závěry disertační práce	71
6. Summary of main outcomes	72
7. Conclusions	73
8. Seznam použitých zkratek	74
9. Seznam použité literatury	75
10. Seznam příloh	86

Abstrakt

Projekt se zabývá možnostmi nutričního ovlivnění diabetu 2. typu (DM2). Cílem projektu bylo zkoumat a) vliv složení jídel a b) vliv frekvence jídel na metabolismus glukózy a další projevy inzulínové rezistence; a charakterizovat vybrané mechanismy účinku dietní intervence u nemocných s DM2.

Projekt byl řešen ve dvou samostatných studiích:

A. Vliv složení jídel byl testován v rámci randomizované studie, která testovala akutní podání tří jídel se stejným kalorickým obsahem a různým složením makronutrientů na glukózovou toleranci, sekreci inzulínu, GIH a markerů oxidačního stresu v plazmě. Zařazeno bylo 50 nemocných s DM2 a 50 věkově odpovídajících zdravých osob (K). Účastníci konzumovali tři různé snídaně se stejným energetickým obsahem (veganský sandwich; V-meal, hamburger; M-meal, nebo sýrovou bagetu; S-meal). Vzorky krve pro analýzu byly odebrány v časech 0 a za 30, 60, 120 a 180 minut po jídle. Nemocní s DM2 měli ve srovnání s K významně vyšší bazální i postprandiální koncentrace glukózy a inzulínu v plasmě ($p < 0,001$); bazální i postprandiální koncentrace téměř všech GIH (s výjimkou ghrelu) ($p < 0,001$) a látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS) byly významně zvýšeny ($p < 0,001$). Zatímco kyselina askorbová, redukovaný glutathion a aktivita superoxid dismutázy byly nižší u pacientů s DM2 v porovnání se zdravými kontrolami ($p < 0,001$). Celková glykemická odpověď na izokalorický potravinový podnět (vysokotuková; M-meal vs. vysokosacharidová snídaně; V-meal) byla srovnatelná přes různý obsah sacharidů, a to jak u zdravých tak diabetických osob. Vysokotuková snídaně bohatá na nasycené tuky a bílkoviny byla ve srovnání s vysokosacharidovou dietou provázena vyšší sekrecí gastrointestinálních hormonů, perzistující hyperinzulinémií a oxidačním stresem, který je akcentován zejména u nemocných s diabetem.

B. Vliv frekvence jídel byl testován v randomizované, překřížené studii. Zařazeno bylo 54 nemocných s DM2. Srovnávali jsme dva jídelní režimy se srovnatelnou kalorickou restrikcí (-500 kcal/d), které byly dodržovány vždy 12 týdnů - režim šesti porcí za den (A6) nebo dvou porcí za den (B2). Nemocní byli vyšetřeni před zahájením studie a na konci obou intervenčních period. Inzulínovou senzitivitu jsme měřili pomocí hyperinzulinového isoglykemického clampu s nepřímou kalorimetrií ke stanovení klidového energetického výdeje (REE). Funkce β -buněk pankreatu byla stanovena během standardního meal testu a kvantifikována pomocí matematického modelu. Koncentrace GIH v plazmě nalačno a po standardním meal testu byly stanoveny multiplex imunoanalýzou. Složení mastných kyselin v sérových fosfolipidech jsme měřili pomocí plynové chromatografie. Obsah tuku v játrech jsme zjišťovali metodou protonové magnetické rezonanční spektroskopie.

Hypokalorická dieta v režimu B2 vedla u nemocných s diabetem k většímu snížení tělesné hmotnosti ($p < 0,001$) a poklesu obsahu tuku v játrech ($p < 0,05$), nižší sérové hladině glykémie nalačno ($p < 0,01$), C-peptidu, glukagonu a nižší inzulínové rezistenci než dieta s větší frekvencí jídel A6. Nižší pokles energetického výdeje při režimu dvou jídel denně a metabolicky příznivé změny ve složení mastných kyselin ve fosfolipidech séra by mohly být jedním z potenciálních mechanismů, které se uplatňují na příznivém efektu snížení počtu porcí denně u diabetiků. Dieta B2 měla zároveň příznivější vliv na depresivní symptomy a pocity hladu, které byly vázané na rozdíly v koncentraci ghrelu nalačno i postprandiálně.

Prokázali jsme, že obsahy tuků a bílkovin v potravinovém podnětu jsou spolu s energetickou náloží významnými faktory, které ovlivňují postprandiální stav. Jsou důležitější než prostý obsah sacharidů a je nutné je brát v úvahu při kalkulaci diabetické diety.

Doložili jsme, že při dietě se sníženým energetickým obsahem hraje u pacientů s DM2 důležitou roli frekvence jídel. Naše výsledky naznačují, že pro diabetiky 2. typu by mohlo být

výhodnější v rámci redukčního režimu konzumovat méně jídel denně, než je běžně doporučováno.

Klíčová slova: Diabetes mellitus 2. typu, postprandiální stav, inzulínová rezistence, oxidační stres, frekvence jídel, hypokalorická dieta, gastrointestinální peptidy, obsah tuku v játrech.

Abstract

The project focuses on dietary interventions in type 2 diabetes (T2D). The aim was to investigate how glucose metabolism and other manifestations of insulin resistance should be influenced by a) the composition of macronutrients and b) frequency of meals; and to characterize the possible mechanisms of these dietary interventions in patients with T2D.

A. In a randomized crossover study, 50 patients T2D and 50 age-matched healthy subjects underwent in a random order meal tolerance tests with three isocaloric meals (vegan sandwich; V-meal, hamburger; M-meal, or cheese sandwich; S-meal. Blood samples for analysis were taken at time 0 and after 30, 60, 120 and 180 minutes after meal ingestion. Plasma concentrations of plasma glucose, insulin, C-peptide, lipids, oxidative stress markers and gastrointestinal hormones (GIHs) were investigated.

Both basal and postprandial plasma concentrations of glucose and insulin were significantly higher in patients with T2D ($p < 0.001$); basal and postprandial concentrations of almost all other GIHs (except for ghrelin) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were significantly increased ($p < 0.001$), while ascorbic acid, reduced glutathione and superoxide dismutase activity were decreased in patients with T2D compared to healthy controls ($p < 0.001$). The meal rich in saturated fat and protein resulted in higher postprandial increase in GIHs, lipids and persistent postprandial hyperinsulinemia and oxidative stress, particularly expressed in patients with T2D. The plasma glucose levels were significantly higher after the meal rich in carbohydrates only at the peak level ($p < 0.01$). The area under the curve of glucose (AUC) was comparable after the meal rich in saturated fat vs. the meal rich in carbohydrates in both groups.

B. In a randomized, crossover study, we assigned 54 patients with T2D to follow two regimens of a hypocaloric diet (-500 kcal/day), each for 12 weeks: six meals a day (A6), and two meals a day (B2). The diet in both regimens had the same macronutrient and energy content. Insulin sensitivity was measured by hyperinsulinemic isoglycemic clamp, rest energy expenditure (REE) was determined by indirect calorimetry and β -cell function was assessed during a standard meal test and quantified using a mathematical model. Plasma concentrations of GIH were determined using multiplex immunoassay. The fatty acid composition in serum phospholipids was measured by gas-liquid chromatography. The hepatic fat content was measured by proton magnetic resonance spectroscopy. In patients with T2D less frequent eating (B2 regimen) reduced body weight ($p < 0.001$), hepatic fat content ($p < 0.05$), fasting plasma glucose ($p < 0.01$), C-peptide, glucagon and insulin resistance more than a diet with the same caloric restriction divided into six more frequent meals. Feelings of hunger were only reduced in the regimen B2 ($p < 0.001$). The basal metabolism interference and changes in the composition of fatty acids in serum phospholipids could be one of the potential mechanisms of the favorable effect of reducing the number of meals per day in patients with T2D.

Our data confirmed increased postprandial oxidative stress and increased postprandial concentrations of most gastrointestinal peptides in patients with T2D compared to healthy controls. Our results suggest that the diet composition and the energy content, rather than the carbohydrate count, should be important considerations for dietary management.

Our data suggest that less frequent eating may be more beneficial for a long-term adherence than to apportion a hypocaloric diet into smaller meals during the day for patients with T2D.

Key words: Type 2 diabetes, postprandial state, insulin resistance, oxidative stress markers, frequency of meals, hypocaloric diet, gastrointestinal peptides, hepatic fat content.

I. ÚVOD DO DISERTAČNÍ PRÁCE A PŘEHLED LITERATURY K JEJÍ PROBLEMATICE

Hlavní podíl na vzniku diabetu 2. typu (DM2) v terénu genetické predispozice má rozvoj inzulinové rezistence (IR) a porucha sekrece inzulinu. Hyperglykémie se dostavuje tehdy, když β -buňky nestačí sekrecí inzulinu překonat jeho zvýšenou potřebu v organismu, která je v tu chvíli nezbytná k udržení homeostázy glukózy. Pro rozvoj diabetu má proto porucha sekrece inzulinu zásadní význam. Inzulinová rezistence poruchu sekrece prohlubuje a podílí se tak na jejím dalším zhoršování [Bergman et al., 2002]. Podstatnou úlohu na obou úrovních má genetická predispozice [Florez, 2008] [Groop and Lyssenko, 2008]. Zvýšená energetická nálož v podobě příjmu hlavně nasycených mastných kyselin (SAFA) a také sacharidů a snížení fyzické aktivity prohlubuje inzulinovou rezistenci a zvyšuje nároky na sekreci inzulinu [James, 2008]. Zvýšení hladiny volných mastných kyselin (FFA) má negativní vliv na sekreci inzulinu. Tento lipotoxický a později i glukotoxický efekt je provázen úbytkem hmoty β -buněk spolu s jejich selhávající sekreční kapacitou [Skrha, 2011].

Úspěšná léčba pacientů s diabetem spočívá ve snížení jejich mortality a morbidity. Jedním z prostředků, jak dosáhnout tohoto cíle, je zlepšení jejich metabolické kompenzace.

Základními parametry hodnocení úrovně kompenzace jsou glykovaný hemoglobin (HbA1c) [Bretzel et al., 1998], jehož hodnota těsně koreluje s plochou pod křivkou glykémie v průběhu 1-3 měsíců před vyšetřením, a glykémie nalačno [UKPDS, 1998]. Glykémie nalačno vypovídá o průměrné glykémii během přibližně jedné třetiny dne. Více než dvě třetiny dne se však organismus pacienta s diabetem nalézá ve stavu postprandiálním, protože většinu dne je pacient, jemuž je doporučována diabetická dieta (většinou 6 jídel denně), ve stavu po jídle.

V posledních letech je při hodnocení průběžné kompenzace diabetu stále více věnována pozornost hladinám glykémie v postprandiálním období. Je opakovaně prokázáno, že zvýšené hladiny krevního cukru po jídle jsou ukazatelem zvýšeného rizika manifestace DM2 a špatné kompenzace. Postprandiální hyperglykémie se významně podílí na celkové hodnotě HbA1c [Ceriello, 2010] a je významným nezávislým rizikovým faktorem manifestace mikro- a makrovaskulárních komplikací diabetu [Ceriello, 2009]. Při léčbě pacientů s DM2 stojí na prvním místě změny životního stylu. Zahrnují vedle zvýšení pohybové aktivity hlavně změnu dietních návyků. Kromě sledování složení diabetické diety má svůj opodstatněný význam i sledování počtu porcí jídla během dne, tj. frekvence jídel.

1. Inzulínová rezistence

Inzulínovou rezistencí rozumíme poruchu účinku inzulínu v cílové tkáni.

Účinek inzulínu na využití a zpracování glukózy je závislý na citlivosti tkání k inzulínu.

Mezi projevy inzulínové rezistence v metabolismu glukózy se uplatňuje zvýšená produkce glukózy játry a snížený inzulín-dependentní odsun glukózy do tkání.

Různorodost projevů syndromu IR je podmíněna širokou škálou účinků inzulínu, který ovlivňuje nejen metabolismus glukózy, lipidů a proteinů, ale podílí se na řízení diferenciaci, růstu, apoptózy a specifických funkcí buněk. Inzulínová signalizační kaskáda je přítomna nejen v typicky inzulín dependentních tkáních (v kosterním svalu, v bílé tukové tkáni a v játrech), ale i v buňkách, které jsou z hlediska transportu glukózy nezávislé na inzulínu (např. β -buňky Langerhansových ostrůvků nebo endotelové buňky). Ačkoli tyto buňky neobsahují glukózové transportéry 4 (GLUT4), obsahují všechny ostatní komponenty signalizační kaskády [Pelikánová, 2011].

1.1. Játra

Nemocní s IR mají nalačno zvýšenou produkci glukózy v játrech [DeFronzo et al., 1989] a ani po jídle u nich nedochází k fyziologické supresi [Groop et al., 1989]. Zvýšená produkce glukózy se u jater vysvětluje zvýšením glukoneogeneze [Magnusson et al., 1992] i glykogenolýzy a podílí se na nich kromě inzulínové rezistence v játrech i zvýšená hladina glukagonu společně se zvýšenou citlivostí na něj [Matsuda et al., 2002]. Dále se negativně uplatňuje zvýšená hladina FFA (lipotoxicita), která brzdí glykolýzu, oxidaci glukózy v játrech a zvyšuje jaterní produkci glukózy zvýšenou expresí a aktivitou fosfoenolpyruvátcarboxykinázy a pyruvátcarboxylázy [Gastaldelli et al., 2000], které jsou klíčovými enzymy v regulaci glukoneogeneze. Na zvýšené glukoneogenezi se může podílet také zvýšená nabídka substrátů (pyruvátu, laktátu, alaninu a glycerolu), která je důsledkem nedostatečného účinku inzulínu na blokádu lipolýzy v tukové tkáni a glykogenolýzy a proteolýzy v kosterním svalu. Samotná hyperglykémie (glukotoxicita) zvyšuje expresi a aktivitu glukóza-6-fosfatázy, klíčového enzymu odsunu glukózy z jater [Clore et al., 2000].

1.2. Kosterní sval

V kosterním svalu se IR manifestuje poruchou odsunu glukózy po jídle a výsledkem je postprandiální hyperglykémie [Ferrannini et al., 1988] [Pendergrass et al., 2007].

U pacientů s DM2 byla popsána celá řada nitrobuněčných poruch účinku inzulínu [Bajaj and DeFronzo, 2003]. Hlavní je porucha transportu glukózy do buňky a její fosforylace [Pendergrass et al., 2007] [Felber et al., 1987] a dále snížení syntézy glykogenu [Shulman et al., 1990].

1.3. Tuková tkáň

Inzulínová rezistence se u buněk bílé tukové tkáně projevuje snížením anti-lipolytického efektu inzulínu, což vede ke zvýšení FFA v plazmě [DeFronzo, 2004]. Chronicky zvýšená hladina FFA stimuluje glukoneogenezi [Bevilacqua et al., 1987], vede k IR v jiných tkáních a spolupodílí se na poruše sekrece β -buněk Langerhansových ostrůvků. Tyto projevy souhrnně označujeme jako lipotoxicitu. Bylo rovněž prokázáno, že zvýšení FFA v plazmě vede k poruše odsunu glukózy do jater [Bajaj et al., 2002] a do kosterního svalu [Itani et al., 2002].

1.4. β -buňky Langerhansových ostrůvků

Pokud jsou β -buňky schopné zvýšit sekreci inzulínu vzhledem k narůstající potřebě při IR, zachovává se normální tolerance glukózy [Diamond et al., 1995]. Selhání β -buněk je pak rozhodujícím faktorem k progresi do glukózové intolerance a k diabetu. Nejdříve se zvyšuje hladina glukózy po jídle a posléze i glykémie nalačno [Bergman et al., 2002].

Studie poukazují na to, že selhání β -buněk se u DM2 vyskytuje dříve a je těžší než se předpokládalo. Při stanovení diagnózy diabetu, je afunkčních více než 80% β -buněk Langerhansových ostrůvků.

1.5. α -buňky Langerhansových ostrůvků

Hladina glukagonu v plazmě je u pacientů s DM2 zvýšená. A to jak nalačno, tak postprandiálně [Matsuda et al., 2002]. Zvýšení hladiny glukagonu je důležitým faktorem, který potencuje produkci glukózy v játrech [Baron et al., 1987]. Ve srovnání se zdravými kontrolami mají pacienti s DM2 vyšší hladinu glukózy nalačno, která úzce koreluje se

zvýšenou hladinou glukagonu. V intervenční studii se po infúzi se somatostatinem snížila hladina glukagonu nalačno o 44% a lačná glykémie klesla o 58%. Dále se ukázalo, že ke zvýšené glukoneogenezi v játrech nevedlo jen samotné zvýšení hladiny glukagonu, ale i zvýšená senzitivita ke glukagonu v játrech [Matsuda et al., 2002]. Ukazuje se, že α -buňky pankreatu se velkou mírou podílejí i na postprandiální hyperglykémii. Mají sníženou senzitivitu k inhibičnímu účinku glukózy a/nebo inzulinu, což vede k poruše útlumu produkce glukózy v játrech po jídle [Ipp, 2000] [Bagger et al., 2014].

1.6. Endotel

Buňky endotelu obsahují glukózové transportéry 1 (GLUT1). Vstup do buňky u nich tedy není závislý na inzulinu [King et al., 1983]. Aktivace inzulinové signální kaskády v endotelových buňkách cestou proteinkinázy B vede ke zvýšení exprese a aktivaci endoteliální syntázy oxidu dusnatého (eNOS). Oxid dusnatý (NO) zprostředkovává vazodilataci. Dále se inzulinová signální kaskáda v endotelu podílí na regulaci exprese látek humorální povahy, které mají vazoaktivní účinky a ovlivňují trombogenezi (VCAM-1, VEGF, ET-1, HO-1, atd.) [Kuboki et al., 2000] [Montagnani et al., 2001].

U inzulinové rezistence je produkce NO snížena, což je dáno inhibicí inzulinem indukované fosforylace eNOS. Dále je NO degradován zvýšeným oxidačním stresem vznikajícím vlivem hyperglykémie uvnitř buňky [Huang, 2009].

1.7. Další tkáně a buňky

V patogenezi inzulinové rezistence a poruchy sekrece inzulinu se mohou různými mechanismy uplatňovat další tkáně a buňky. V současné době je intenzivně diskutována role CNS, ledvin, střeva a střevního mikrobiomu, buněk imunitního systému či kostní dřeně [Pelikanova, 2014].

2. Postprandiální stav

Postprandiální stav (absorptive state) následuje bezprostředně po jídle a trvá u zdravého člověka průměrně čtyři hodiny. Je významně ovlivněn složením jídla. Postprandiální glykémie je definována jako koncentrace glukózy v krvi po jídle. U zdravých osob dosahuje vrcholu za 60 minut a nepřekračuje 6,8 mmol/l. K hladinám odpovídajícím glykémii nalačno dochází za 2-3 hodiny po jídle. Hladina glykémie je určována řadou faktorů (časem podání jídla, množstvím jídla, obsahem sacharidů, tuků i bílkovin, inzulínovou a glukagonovou sekrecí, rychlostí vyprazdňování žaludku, rychlostí absorpce živin v tenkém střevě a fyzickou aktivitou před a po jídle. U zdravých jedinců je hladina glykémie udržována ve velmi úzkém rozmezí, což dokazují mnohé studie s kontinuální monitorací glykémie [Mazze et al., 2008].

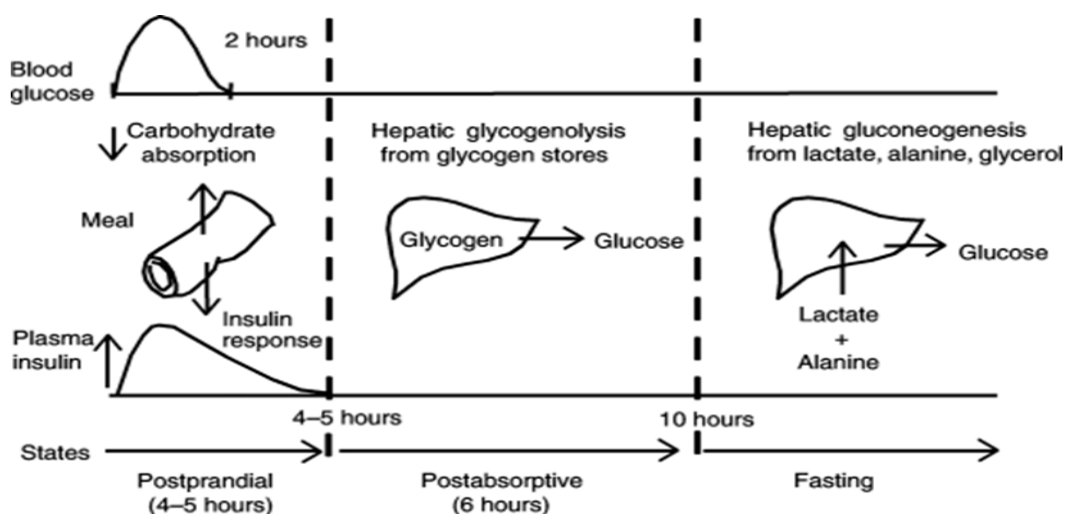
Po příjmu potravy je fyziologicky zablokována produkce glukózy. Vlivem inzulínu je stimulován inzulín-dependentní odsun a vlivem hyperglykémie non-inzulín-dependentní odsun glukózy do buněk. Zároveň hyperglykémie blokuje její produkci v játrech a v ledvinách. Po perorálním příjmu je asi 60% glukózy vychytáno játry a 40% svalovou tkání. Po intravenózním podání odpovídá za 90% odsun glukózy svalová tkáň.

Asi 10-25 % absorbované glukózy zůstane v gastrointestinálním traktu (first passage). Většina glukózy se dostává během pár minut po jídle do systémové cirkulace a je následována prudkým vzestupem glykémie [Dinneen et al., 1992]. Toto fyziologické zvýšení hladiny glykémie netrvá u zdravých jedinců déle než dvě hodiny. Uplatňují se vlivy hormonální, autoregulační (hyperglykémie, hypoglykémie) a nervové (sympatikus, parasympatikus) zajišťující přesmyk z anabolické do katabolické fáze a opačně [Monnier, 2000]. Zvýšení hladiny triglyceridů může u zdravého jedince po tučném jídle trvat až 4-8 hodin.

Po postprandiálním období následuje další fáze, která je v anglické literatuře nazývána jako „postabsorptive state“ a trvá průměrně 6 hodin. Normální hladina glykémie je udržována hormonálně regulovanou glykogenolýzou v játrech, kde dochází k hydrolyzaci glykogenu naštědáního během předchozí postprandiální fáze.

Asi za 10 hodin po posledním příjmu potravy nastává období lačnění (real fasting state). V játrech je postupně glykogenolýza nahrazována glukoneogenezí (z laktátu, alaninu a glycerolu) [Monnier et al., 2007] (**Obrázek 1**), na které se kromě jater podílejí i ledviny. U zdravého jedince za normálního denního režimu (při třech jídlech denně) představuje postprandiální období zhruba polovinu celého dne. Při příjmu více porcí jídla během dne, jak

je obvykle pacientům s diabetes mellitus doporučováno, zaujímá období po jídle více jak 2/3 dne.



Obrázek 1: Hormonální a metabolické změny po perorálním příjmu glukózy. (Monnier et al. (2007) The loss of postprandial glycemic control precedes stepwise deterioration of fasting with worsening diabetes. *Diabetes Care* 30: 263-269)

2.1. Postprandiální stav u diabetu 2. typu

Přítomnost inzulinové rezistence a/ nebo diabetes mellitus zcela mění průběh postprandiálního stavu. Hyperglykémie po jídle je vyšší, trvá déle a má vyšší variabilitu [Polonsky et al., 1988].

Je všeobecně doporučováno měřit hodnotu postprandiální glykémie za 2 hodiny po jídle. Vrchol hladiny glykémie u zdravých jedinců detekujeme za 1 hod, u nemocných s DM2 je vrchol opožděn a dosahuje svého maxima nejdříve za 2 hodiny. Jako cílovou hladinu postprandiální glykémie pro uspokojivou kompenzaci diabetu považujeme glykémii nižší než 7,7 mmol/l [Kvapil, 2006]. Zvýšení postprandiální glykémie o pouhý 1 mmol/l relativní riziko úmrtí zdvojnásobuje. Osoby s glykemií nalačno v rozmezí normálních hodnot a vyšší postprandiální glykemií mají stejné relativní riziko smrti jako osoby s hodnotami glykémie nalačno převyšující hodnotu 7 mmol/l a vyšší postprandiální glykemií [DECODE, 1999]. Příčinami zvyšování postprandiální glykémie nad fyziologické rozmezí jsou přítomná inzulinová rezistence a/nebo porucha inzulinové sekrece a zvýšený výdej glukózy játry [DeFronzo, 2004]. Období po jídle, které je spojeno s rizikovými hormonálními, metabolickými a prozánětlivými změnami, se významně prodlužuje. Tím se významně

zvyšuje riziko aterosklerózy. Podle epidemiologických studií je zvláště silný vztah popisován mezi hladinou postprandiální glykémie a kardiovaskulární morbiditou [Decode Study Group, 2001]. Klinické observační studie potvrzují, že postprandiální hyperglykémie je silnější rizikový faktor pro kardiovaskulární příhodu než glykémie nalačno [Hanefeld et al., 1996] [Cavalot et al., 2006].

V jiné studii u pacientů s DM2 trvajících 14 let byla postprandiální glykémie významným prediktorem kardiovaskulárních příhod i celkové mortality [Cavalot et al., 2011]. V další studii u pacientů s DM2 zvýšená hladina glukózy 2 hod po jídle představovala větší než dvojnásobné riziko kardiovaskulární mortality než u jedinců bez diabetu [Shaw et al., 1999].

U diabetiků je postprandiální stav vysoce proaterogenní [Ceriello et al., 1999]. Je prokázáno, že postprandiální hyperglykémie vede ke vzniku vystupňovaného oxidačního stresu, který působí poruchu funkce endotelu a vznik lokálního zánětu [Ceriello, 2003]. Navíc se ukazuje, že i zvýšená hladina lipidů po jídle je rizikovým faktorem aterosklerózy [Cavallero et al., 1994] a byl prokázán nezávislý škodlivý efekt zvýšené postprandiální hladiny lipidů a glykémie na cévní stěnu se společným mediátorem, a tím je oxidační stres [Ceriello et al., 2004].

2.2. Postprandiální oxidační stres

Oxidační stres je v současné době považován za klíčovou příčinu rozvoje pozdních komplikací u diabetu. Hyperglykémie, která je hlavním vyvolavatelem vystupňovaného oxidačního stresu, vede zejména v kombinaci s dyslipoproteinémií k urychlení aterogeneze. A to jak glykémie akutní (postprandiální), tak chronické zvýšení hladiny glykémie.

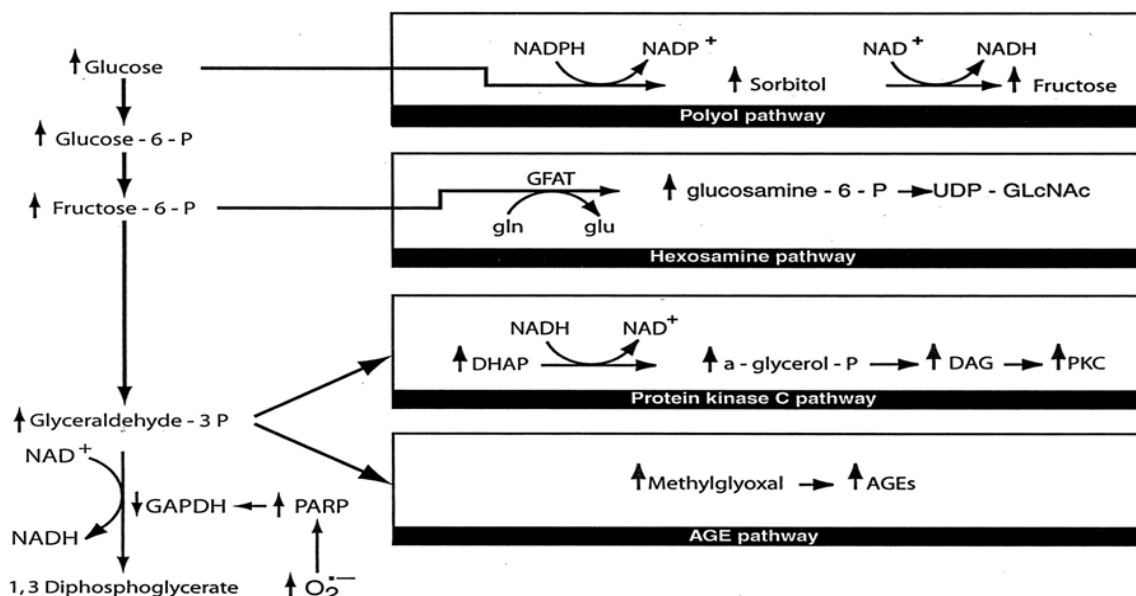
Vystupňovaný oxidační stres vzniká při nepochybné mezi tvorbou reaktivních forem kyslíku (ROS) a jejich zánikem pomocí enzymového a neenzymového ochranného systému [Škrha, 2010]. Pokud se kapacita antioxidačního systému zvýší, organismus udrží úroveň oxidačního stresu na fyziologické hladině. Ve studii na koronárních endoteliálních buňkách byl po navození akutní hyperglykémie pozorován vzestup aktivity superoxiddismutázy [Weidig et al., 2004]. U pacientů s diabetem je ochranná antioxidační kapacita nedostatečná [Ceriello et al., 1998]. Bylo zjištěno, že 2-3 hodiny po jídle u nich stoupají některé ukazatele oxidačního, nitračního a karbonylového stresu: substance reagující s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS) [Ceriello et al., 1998], nitrotyrosin [Ceriello et al., 2002], konjugované dieny [Duthie et al., 1992] a dikarboxyly [Beisswenger et al., 2001].

Jako nejvíc škodlivá se ukazuje být fluktuace hladiny glukózy (vysoká glykemická variabilita) v porovnání s konstantní chronickou hyperglykemií [Colette and Monnier, 2007] [Ampudia-Blasco and Ceriello, 2010, Monnier et al., 2006]. Endoteliální buňky nejsou chráněné „down regulací“ receptorů pro glukózu a při hyperglykémii se glukóza dostává do buňky podle koncentračního gradientu [Kaiser et al., 1993].

Při zvýšené intracelulární koncentraci glukózy, dochází k vystupňované glykolýze, zvýší se nabídka pyruvátu a zvýšená nabídka elektronů pro dýchací řetězec v mitochondriích způsobí vznik superoxidového radikálu, který hraje důležitou roli v patogenezi komplikací diabetu [Brownlee, 2001] [Nishikawa et al., 2000]. Vzniklý superoxidový radikál inhibuje nepřímo klíčový enzym glykolýzy glyceraldehydfosfátdehydrogenázu (GAPDH) a zvýšená nabídka substrátů retrogradně aktivuje jejich alternativní zpracování ve čtyřech cestách, které vedou k rozvoji cévních komplikací 1) neenzymová glykace, 2) aktivace proteinkinázy C, 3) hexosaminová a 4) polyolová cesta [Ceriello, 2009] (viz Obrázek 2).

Podobně jako hyperglykémie působí stejným mechanismem i volné mastné kyseliny, jejichž koncentrace je zvýšena u DM2 vlivem inzulinové rezistence. Betaoxidací vznikající acetylkoenzym A se stává stejným zdrojem pro Krebsův cyklus jako glukóza.

Vedle oxidačního stresu se rozvíjí i tzv. nitrační stres. V endotelové buňce reaguje NO se superoxidovým radikálem za vzniku peroxynitritového radikálu, který je značně nestabilní a reaguje dále a navíc dochází k zániku potřebného NO [Kowluru, 2003].



Obrázek 2: Čtyři hlavní cesty alternativní přeměny glukózy při inhibici GAPDH superoxidovým radikálem (Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813–820)

2.3. Prandiální sekrece inzulinu

Stimulovaná sekrece inzulinu (prandiální) představuje inzulín vyplavovaný při příjmu potravy a hraje důležitou roli v regulaci postprandiální glykémie. Inzulín postprandiálně stimuluje odsun glukózy do cílových tkání, kde podporuje tvorbu zásobního glykogenu, lipogenezi a proteosyntézu. Podle časového průběhu hodnotíme po perorálním podání nutrientů časnou a pozdní fázi sekrece inzulinu. Časnou fází označujeme sekreci během prvních 30 - ti minut a odpovídá vyplavení zásobního inzulinu ze sekrečních granul. Během pozdní fáze sekrece je vyplavován nově syntetizovaný inzulín. Rychlost a míra vzestupu sekrece inzulinu závisí na součinnosti centrálního nervového systému, rychlosti vyprazdňování žaludku a funkci trávicího ústrojí, enteroinzulární ose a změnách hladin nutrientů v plasmě. U diabetiků sledujeme poruchu sekrece nejdříve na úrovni časné fáze [Gerich, 2002]. Sekrece inzulinu je řízena především koncentrací glukózy v krvi, ale uplatňují se i další nutrienty (některé aminokyseliny, ketolátky a mastné kyseliny). Glukóza vstupuje do β -buněk pomocí glukózového transportéru 2 (GLUT 2), dochází k její oxidaci s následným zvýšením adenosintrifosfátu (ATP). Tvorbu ATP potencují další nutrienty, které vstupují do děje na úrovni acetyl-CoA (mastné kyseliny), či Krebsova cyklu (aminokyseliny). Mastné kyseliny mají významné postavení v regulaci sekrece inzulinu, protože stimulují jeho sekreci navíc aktivací proteinkinázy C (PKC) diacylglycerolem (DAG) a přímým ovlivněním mikrofilament. Při vyšší hladině glykémie dochází k urychlení metabolismu glukózy a tvorbě malonyl-CoA v cytoplasmě, který inhibuje enzym karnitin-palmitoyl-acyl-transferázu, která přenáší FA do mitochondrií, kde mohou být oxidovány. Zvýšení FA-acyl-CoA v cytoplasmě vede k další stimulaci sekrece inzulinu. Uvedený mechanismus vysvětluje mnohonásobné zvýšení glukózou stimulované sekrece inzulinu po přidání FA [Warnotte et al., 1994]. Mastné kyseliny hrají roli i při prohlubování sekreční poruchy u diabetu. Pokud jsou β -buňky vystaveny chronickému zvýšení nebo opakovaným výkyvům hladiny glykémie (postprandiálně), dochází k potlačení jejich citlivosti na sekreční podněty a k urychlení zániku apoptózou. I zvýšená hladina volných mastných kyselin působí na β -buňky toxicky a vede ke snížení sekrece inzulinu [Prentki and Nolan, 2006]. Podle stimulačních vlivů je inzulinová sekrece rozdělována do tří etap: 1. cefalická sekreční část, 2. gastroenterální část (následek uvolňování působků ze žaludku a tenkého střeva při trávení potravy), 3. vlastní nutriční část (stimulace β -buněk glukózou, některými aminokyselinami nebo mastnými kyselinami). Hormonální a nervové faktory bývají označovány jako modulátory nebo sekundární stimulatory, neboť jsou účinné jen za přítomnosti látek primární stimulace. V poslední době je

věnována mimořádná pozornost gastroenterální části inzulínové sekrece. Pokud je stejné množství glukózy podané perorálně nebo intravenózně, neliší se u zdravého jedince hladiny glykémie, ale významněji je zvýšená hladina uvolněného inzulínu po podání glukózy ústy. Tento jev se nazývá inkretinový efekt. U zdravých jedinců je až 70% celkové inzulínové odpovědi na množství podané glukózy vyvoláno právě inkretiny.

2.4. Vliv ostatních makronutrientů na postprandiální glykémii

Složení jídla má vliv na vývoj postprandiálního stavu. Doporučení pro dietní léčbu diabetiků se opírá o výpočet obsahu sacharidů. Jedním ze standardně používaných edukačních modelů využívaných zejména při inzulínové léčbě je kalkulace výměnných jednotek [American Diabetes, 2013].

Existují však doklady pro to, že postprandiální metabolická odpověď je významně modifikována i obsahem dalších makronutrientů, t.j. tuků a bílkovin, které se mohou uplatňovat různými mechanismy. Jak přímým vlivem na β -buňky, tak zprostředkovaně - změnou sekrece gastrointestinálních hormonů (GIH), které mají prokázaný vliv na průběh postprandiálního stavu (viz dále).

Vliv proteinů na vývoj postprandiální glykémie byl potvrzen v mnoha studiích. Je rozhodující o jaký druh proteinu se jedná a jaké má složení aminokyselin [Pal and Ellis, 2010]. Příznivé účinky na pokles hladiny glykémie u diabetiků byly přisuzovány hlavně proteinu v syrovátce a to mechanismem zvýšené sekrece „glucagon-like peptide-1“ (GLP-1) a jeho inzulínotropnímu efektu a dále efektu na zpomalení vyprazdňování žaludku [Bendtsen et al., 2013]. Na druhou stranu ve studii u pacientů s DM2 trávící 6 měsíců vedl vyšší příjem proteinů v potravě ke snížení inzulínové senzitivity [Larsen et al., 2011]. V intervenční studii s pacienty s diabetes mellitus 1. typu (DM1) po přidání samotného proteinu do jídla se spotřeba inzulínu zvýšila [Peters and Davidson, 1993].

Dále bylo zjištěno, že vyšší příjem proteinů z masa vedl ke zvýšení incidence diabetu na rozdíl od vyššího příjmu proteinů rostlinného původu [Sluijs et al., 2010]. To potvrzují i rozsáhlé epidemiologické studie, které dokazují souvislost mezi zvýšeným příjmem červeného masa a zvýšenou incidencí DM2 [Vang et al., 2008].

Po příjmu potravy bohaté na tuky dochází rovněž ke zpomalení vyprazdňování žaludku, což vede ke zpomalení absorpce glukózy [Gentilcore et al., 2006]. V jídelníčku se nejčastěji objevují nasycené (SAFA) (kyseliny stearová a palmitová), mononenasycené (MUFA) (kyselina olejová) a polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) (kyselina linolová), jejichž

zastoupení se dá sledovat i v plazmě, tkáních a i ve fosfolipidech buněčných membrán [Hodson et al., 2008]. Dle studií mělo příznivé účinky na zlepšení inzulinové sensitivity, když se SAFA nahradily MAFA nebo PUFA [Riserus et al., 2009].

Podle studií na zdravých dobrovolnících [Nuttall et al., 1985], pacientech s DM1 [Peters and Davidson, 1993] i pacientech s DM2 [Estrich et al., 1967] mají ostatní makronutrienty vliv na vzestup postprandiální glykémie.

Je dobře známo, že zvýšený příjem tuku v potravinách a zvýšená hladina FFA v plazmě vedou k poruše inzulinové sensitivity a zvyšují výdej glukózy v játrech [Savage et al., 2007]. Při snížení příjmu tuků v potravinách se v intervenční studii zlepšila senzitivita na inzulin [Bajaj et al., 2004]. To bylo potvrzeno i ve studii na zdravých dobrovolnících, kdy se při clampovém vyšetření (vyšetření ke zjištění inzulinové sensitivity) zvýšila inzulinová rezistence při zvýšené hladině FFA v plazmě během několika hodin [Gormsen et al., 2011]. Řada studií z posledních let u pacientů s DM1 jednoznačně dokladuje, že dávku inzulinu k jídlu je třeba upravit i vzhledem k obsahu ostatních makronutrientů než jen k počtu sacharidů. Ukazuje se, že jídla obsahující hodně bílkovin a/nebo tuků zvyšují postprandiální hladinu glykémie a vyžadují u pacientů s DM1 adekvátní zvýšení dávky inzulinu k jídlu tak, aby byla hladina glykémie normalizována [Bell et al., 2016].

2.5. Gastrointestinální a chuťové hormony

Děje, které se podílejí na řízení glykémie, jsou mnohem komplexnější. Zejména podíl inkretinů a dalších střevních působků, popřípadě podíl poruchy regulace jejich sekrece či účinku, se ukazuje jako velmi významný.

Bylo zjištěno, že přítomnost sacharidů, tuků i bílkovin ve střevním lumen stimuluje sekreci široké škály gastrointestinálních hormonů. [Nauck et al., 1986].

2.5.1. Inkretiny: GLP-1 a GIP

Pokud stejné množství glukózy nebo i jiných makronutrientů podáme perorálně, dojde k větší sekreci inzulinu, než po aplikaci stejného množství intravenózně. Tento tzv. inkretinový efekt je přisuzován sekreci a inzulinotropnímu efektu dvou GIH – gastric inhibitory polypeptide (GIP) a GLP-1. U zdravých jedinců se inkretinový efekt podílí na celkové postprandiální sekreci inzulinu až v 70 - ti % [Knop et al., 2007, Woerle et al., 2012].

GLP-1 je syntetizován v enterokrinních L-buňkách, které jsou roztroušeny po celé délce tenkého i tlustého střeva. GLP-1 stimuluje kromě sekrece inzulínu také sekreci somatostatinu a naopak inhibuje sekreci glukagonu. Dále má vliv na zpomalení motility žaludku a snižuje chuť k jídlu.

GIP je tvořen v enterokrinních K-buňkách, které se nacházejí především v proximální části trávicí soustavy, v duodenu a v jejunu. Podnětem k jeho sekreci je, stejně jako v případě GLP-1, vazba natrávených živin na membránové receptory. GIP sekreci glukagonu u diabetiků paradoxně stimuluje a na motilitu žaludku nemá vliv. Naopak velmi výrazný vliv má GIP v tukové tkáni, kde zvyšuje adipozitu a snižuje senzitivitu k inzulínu. Jak aktivní GLP-1 tak GIP jsou štěpeny výhradně proteázou dipeptidylpetidázou 4 [Campbell and Drucker, 2013].

V posledních letech se hodně debatuje o tom, jestli je porušený inzulínotropní účinek inkretinů u pacientů s DM2 způsoben jejich sníženou sekrecí, či sníženou funkcí. Podle nedávné metaanalýzy nemají pacienti s DM2 sekreci GLP-1 sníženou, a to po příjmu samotné glukózy ani během meal testu se standardní snídaní [Calanna et al., 2013]. Ani sekrece GIP není u pacientů s DM2 snižena oproti zdravým kontrolám [Cernea, 2011]. Snižená sekrece GLP-1 byla pozorována jen u skupiny pacientů, kteří měli velmi špatnou kompenzaci diabetu. Zdá se, že u pacientů s DM2 se inkretinový efekt zhoršuje sekundárně [Meier, 2009]. Přesný mechanismus poruchy funkce není známý, ale předpokládá se, že za ním stojí nejen hyperglykémie, ale i hyperlipidémie, které vedou k poruše citlivosti β -buněk k účinkům inkretinů, tím že způsobí snížení exprese receptorů pro oba hormony [Poitout, 2013]. Ostatní makronutrienty v potravě, tj. tuky a bílkoviny, mají rovněž podíl na stimulaci sekrece obou hormonů. Bylo zjištěno, že dochází k větší sekreci GIP po jídle obsahujícím i proteiny a tuk než po samotné glukóze [Vollmer et al., 2008]. Je pravděpodobné, že sekreci GIP nejvíce stimuluje tuk a GLP-1 sacharidy [Rijkkelijkhuizen et al., 2010]. U proteinů nejsou data konzistentní a byla popsána, jak zvýšená, tak i snížená sekrece obou hormonů [Carrel et al., 2011].

2.5.2. PYY a PP

Mezi další gastrointestinální hormony, k jejichž sekreci dochází postprandiálně, patří „peptide YY“ (PYY) a „pancreatic polypeptide“ (PP). K sekreci PYY dochází hlavně v L-buňkách ilea společně s GLP-1 [Kim et al., 2005]. PP je produkován PP buňkami Langerhansových ostrůvků slinivky břišní. Má hlavně parakrinní účinek, tj. působí na buňky v bezprostředním okolí. Funkce PP není dosud jednoznačně známá. Spolupodílí se na regulaci exokrinního

pankreatu (inhibuje sekreci pankreatické šťávy) a žluči. Oba hormony se spolupodílí na regulaci příjmu potravy, chuti k jídlu a celkové energetické bilanci organismu. Po jejich intravenózní aplikaci u zdravých jedinců dochází k útlumu chuti k jídlu [Batterham et al., 2003]. K jejich sekreci dochází po všech makronutrientech, ale největším stimulem pro jejich sekreci je u zdravých jedinců přítomnost volných mastných kyselin v tenkém střevě [Essah et al., 2007]. Ve studii bylo zjištěno, že IR a hyperglykémie vedou k poruše sekrece PYY po tučném jídle [Fernandez-Garcia et al., 2014].

2.5.3. Chuťové hormony: ghrelin a leptin

Chuťové hormony mají vliv na udržování energetické bilance a hmotnosti organismu tím, že u zdravých štíhlých jedinců potlačují nebo stimulují chuť k jídlu a hlad, a mají popsáný i vliv na klidový energetický výdej. Dále se zdá, že se přímo podílí na iniciaci příjmu potravy a nastolení pocitu sytosti [Perry and Wang, 2012]. U obézních jedinců a pacientů s DM2 dochází k poruše jejich fyziologické funkce, což se vysvětluje přítomnou hyperinzulinémií při IR [Hamed et al., 2011].

Ghrelin je orexigenní peptid, který stimuluje chuť k jídlu a příjem potravy. K jeho sekreci dochází v neuroendokrinních buňkách žaludku a působí jako neuropeptid v CNS [Dickson et al., 2011].

U zdravých jedinců se jeho koncentrace zvyšuje při lačnění a po jídle dochází k prudkému útlumu jeho sekrece [Wren et al., 2000], nejspíše vzestupem hladiny inzulínu [Hagemann et al., 2007]. U obézních jedinců a pacientů s DM2 je bazální sekrece ghrelinu snižena a po jídle nedochází k fyziologickému útlumu [English et al., 2002] [Malinska et al., 2014]. Po redukci hmotnosti dochází ke zvyšování plazmatické hladiny ghrelinu [Purnell et al., 2007].

Leptin, adipokin tvořený v buňkách bílé tukové tkáně, má opačné účinky než ghrelin. Bylo zjištěno, že receptory pro oba dva hormony se vyskytují dokonce na stejných buňkách CNS [Perello et al., 2012]. Leptin snižuje chuť k jídlu a příjem potravy. Obézní jedinci a pacienti s DM2 mají hladinu leptinu zvýšenou a byla u nich rovněž popsána rezistence k jeho účinkům [Enriori et al., 2007]. Vyšší hladina leptinu silně koreluje s IR. Vyšší senzitivita k jeho účinkům pak pravděpodobně vede k ochraně proti obezitě, způsobené nadměrným příjmem potravy [Ahima and Flier, 2000].

3. Frekvence jídel

V současné době se diskutuje o tom, zda je zdravější jíst častěji menší jídla, nebo méně často jídla větší. Nadměrný příjem energie je spojen se zvýšeným výskytem kardiovaskulárních chorob, diabetu a některých druhů rakoviny a je hlavní příčinou invalidity a úmrtí v industrializovaných zemích [Vischer and Seidell, 2001].

Mezi základní léčebná opatření u diabetiků s nadváhou a obezitou patří režimová opatření, tj. redukční dieta a zvýšení fyzické aktivity. V dietě však kromě omezení kalorického příjmu může hrát roli i frekvence jídel. Ačkoli běžně doporučovaná schémata pro zdravou výživu počítají s rozdělením kalorického příjmu do minimálně pěti porcí denně, v posledních letech se objevila řada experimentálních dokladů o pozitivních efektech protrahovaného hladovění a zprávy o výhodách, které by mohla mít konzumace jídla s nižší frekvencí pro léčbu obezity a případně dalších civilizačních chorob. Obvykle je diabetikům doporučováno jíst během dne 5-6 menších jídel. Předpokládá se, že pokud se jí častěji, povede to ke snížení hladu a tím ke snížení energetického příjmu a tělesné hmotnosti. Navzdory tomu, jak je často deklarováno, jíst častěji během dne nevede ke snížení kalorického příjmu a k redukci váhy. Toto potvrdila i nedávno provedená rozsáhlá metaanalýza [Raynor et al., 2015].

Pokusy na zvířatech podporují antidiabetický vliv kalorické restrikce a diet s přechodným půstem. Režimy s přechodným půstem, jako je „every-other-day fasting“ (EODF), každý druhý den půst, nejčastěji používaný protokol ve studiích se zvířaty, mohou prodloužit délku života u krys i myší. Kalorická restrikce i EODF snižují u hlodavců plazmatické hladiny glukózy a inzulínu a zlepšují glukózovou toleranci [Anson et al., 2003].

Mechanismy, kterými restrikce kalorií a snížená frekvence jídel či přechodné hladovění může u hlodavců zabránit rozvoji různých nemocí a prodloužit délku života, zahrnují snížení oxidačního stresu a zvýšenou odolnost k jeho působení [Mattson, 2005] [Anson et al., 2003]. Vliv frekvence jídel na lidské zdraví a dlouhověkost však není jasný [Mattson, 2005]. Podle observačních studií na lidech může častější příjem potravy, více než 3x denně, vést k nadváze a obezitě [Howarth et al., 2007] a k celkovému vyššímu příjmu energie, protože více stimuluje chuť k jídlu [Duval et al., 2008]. Studie zabývající se frekvencí jídel u pacientů s diabetem 2. typu jsou velmi omezené jak trváním sledování, tak i počtem sledovaných pacientů. V randomizované kontrolované studii nevedl častější příjem potravy k větší redukci příjmu kalorií a snížení hmotnosti [Bachman and Raynor, 2012]. V jiné studii bylo prokázáno, že pro pacienty s DM2 bylo jednodušší udržet uspokojivou kompenzaci diabetu, pokud jedli jedno

větší jídlo bohaté na vlákninu, než více menších porcí [Fernemark et al., 2013]. Bylo prokázáno, že větší jídlo uvolní při metabolismu více tepelné energie než jídlo se stejným energetickým obsahem rozdělené do šesti menších porcí [Tai et al., 1991].

II. NAŠE VÝZKUMNÁ PRÁCE

V první části disertační práce se zaměřujeme na problematiku postprandiálního stavu po akutní dietní intervenci izokalorickými dietami a možnostmi jeho ovlivnění složením makronutrientů ve stravě. Modifikací skladby makronutrientů je možné ovlivnit nejen metabolické parametry, ale i míru oxidačního stresu, zánětlivé parametry a sekreci gastrointestinálních hormonů (GIH) po jídle. Ve druhé části práce hodnotí vliv snížení frekvence jídel a tím snížení četnosti postprandiálních stavů na metabolismus glukózy a další projevy metabolického syndromu u pacientů s DM2. Disertační práce zahrnuje data ze šesti publikovaných článků (Přílohy 1-6).

1. Hypotézy a cíle

1.1. Studie A: Vliv akutního podání tří jídel se stejným obsahem energie a různým složením na sekreci inzulínu a střevních hormonů u pacientů s diabetem 2. typu a u zdravých osob. (Přílohy 1 a 2)

Hypotézy: Jídlo s vysokým obsahem nasycených tuků a proteinů (fast food hamburger) povede ve srovnání s veganským jídlem ke zvýšené postprandiální hladině triglyceridů, mastných kyselin a markerů oxidačního stresu. Dále povede ke snížené hladině GIH u pacientů s DM2. U zdravých kontrol nebudou plazmatické hladiny GIH po obou jídlech rozdílné.

U pacientů s DM2 bude hyperglykémie a hyperlipidémie po jídle provázena zvýšeným oxidačním stresem. Zvýšené ukazatele oxidačního stresu po jídle budou korelovat se změnou sekrece GIH, kterou budeme u pacientů s DM2 sledovat.

Cíle: Testovat vliv akutního podání dvou jídel se stejným kalorickým obsahem, ale různým složením makronutrientů (veganské jídlo s vyšším obsahem sacharidů a fast food hamburger s vyšším obsahem nasycených tuků), na sekreci inzulínu, GIH a markerů oxidačního stresu v plazmě u nemocných s DM2 a u zdravých kontrol. Zjistit, zda budou tyto změny rozdílné u nemocných s DM2 a u zdravých kontrol.

Sledovat změny v postprandiální sekreci gastrointestinálních a chuťových peptidů společně se stanovením změn ukazatelů oxidačního stresu u pacientů s DM2 v porovnání se zdravými kontrolami.

1.2. Studie B: Vliv frekvence jídel na inzulínovou rezistenci, sekreci inzulínu a střevních hormonů a jaterní steatózu u pacientů s diabetem 2. typu (Přílohy 3-6).

Hypotézy: Nižší frekvence jídel povede ke snížení plazmatické koncentrace inzulínu (jako výsledek period půstu), sníží inzulínovou rezistenci, obsah tuku v játrech a ukazatele zvýšeného oxidačního stresu. Naopak častá jídla (a následné vyšší plazmatické koncentrace inzulínu) povedou k vyššímu hromadění tuku v játrech a k vyšší inzulínové rezistenci. Snížení frekvence jídel při hypokalorické dietě povede k většímu úbytku hmotnosti než dietní režim rozdělený do více menších porcí během dne.

Hypokalorický dietní režim s menším počtem porcí během dne, vedoucí k většímu poklesu hmotnosti, bude provázen snížením koncentrace GIH: gastric inhibitory peptide (GIP), glucagon-like peptide-1 (GLP-1), peptide YY (PYY), pancreatic polypeptide (PP) a leptinu a zvýšením koncentrace ghrelinu nalačno. Po jídle bude větší vzestup sérových koncentrací „hormonů sytosti“ (GLP-1, PYY and PP) a větší pokles ghrelinu.

Hypokalorický dietní režim s menším počtem porcí během dne bude pacienty s DM2 lépe tolerován. Bude mít efekt na zlepšení kvality života, Beckovo skóre deprese a jídelní chování. Hypokalorický dietní režim povede ke zmenšení frakce nasycených mastných kyselin ve fosfolipidech séra. Lepší efekt budeme pozorovat při menším počtu jídel během dne a námi sledované změny budou korelovat se zlepšením inzulínové senzitivity u pacientů s DM2.

Cíle: Zjistit vliv frekvence jídel (šesti vs. dvou jídel denně) se stejnou kalorickou restrikcí (-500 kcal/den) na kompenzaci diabetu, inzulínovou rezistenci, sekreci inzulínu a další projevy metabolického syndromu (obsah tuku v játrech a sérové koncentrace markerů oxidačního stresu) u nemocných s DM2 po tříměsíční dietní intervenci.

Zjistit vliv frekvence jídel při hypokalorickém dietním režimu na sérové koncentrace gastrointestinálních a chuťových peptidů nalačno a na jejich postprandiální odpověď po mealtestu (testu se standardní snídaní).

Zjistit vliv frekvence jídel (šesti vs dvou jídel denně) se stejnou kalorickou restrikcí (-500 kcal/den) na kvalitu života, Beckovo skóre deprese a jídelní chování u pacientů s DM2. Zjistit vliv frekvence jídel na složení mastných kyselin ve fosfolipidech séra, a zda se případné změny mohou podílet na zlepšení inzulinové senzitivity u pacientů s DM2.

2. Studie A: Vliv akutního podání tří jídel se stejným obsahem energie a různým složením na sekreci inzulinu a střevních hormonů u pacientů s diabetem 2. typu a u zdravých osob.

2.1. Metodika

2.1.1. Design studie a soubor účastníků:

Do randomizované překřížené studie bylo zařazeno 50 nemocných s DM2 a 50 věkově odpovídajících zdravých osob viz tabulka 1 (Charakteristika souboru). Celkem prošlo skríninkem 178 pacientů s DM2 a 276 zdravých kontrol. Detailní průběh zařazování do studie viz obrázek 3 (Nábor pacientů do studie a její průběh). Kritéria pro zařazení byla následující: ženy i muži ve věku 30-70 let; Body Mass Index (kg/m²) nižší než 30; dobrovolník nesplňuje diagnostická kritéria metabolického syndromu – tzn. má maximálně 2 z těchto rizikových faktorů: abdominální obezita – obvod pasu muži > 102 cm, ženy > 88 cm, krevní tlak léčený více než 2 antihypertenzivy nebo >130/85 mm Hg, cukrovka nebo porucha glukózové tolerance nebo glykémie nalačno > 5,6 mmol/l, HDL cholesterol – léčba nebo muži < 1 mmol/l, ženy < 1,3 mmol/l, triglyceridy – léčba nebo > 1,7 mmol/l; rodiče ani sourozenci nemají cukrovku. Kritéria pro vyřazení byla: současný alkoholismus nebo užívání drog; těhotenství nebo kojení; onemocnění štítné žlázy, onkologické onemocnění, nemoci srdce; léčba inzulinem v minulosti.

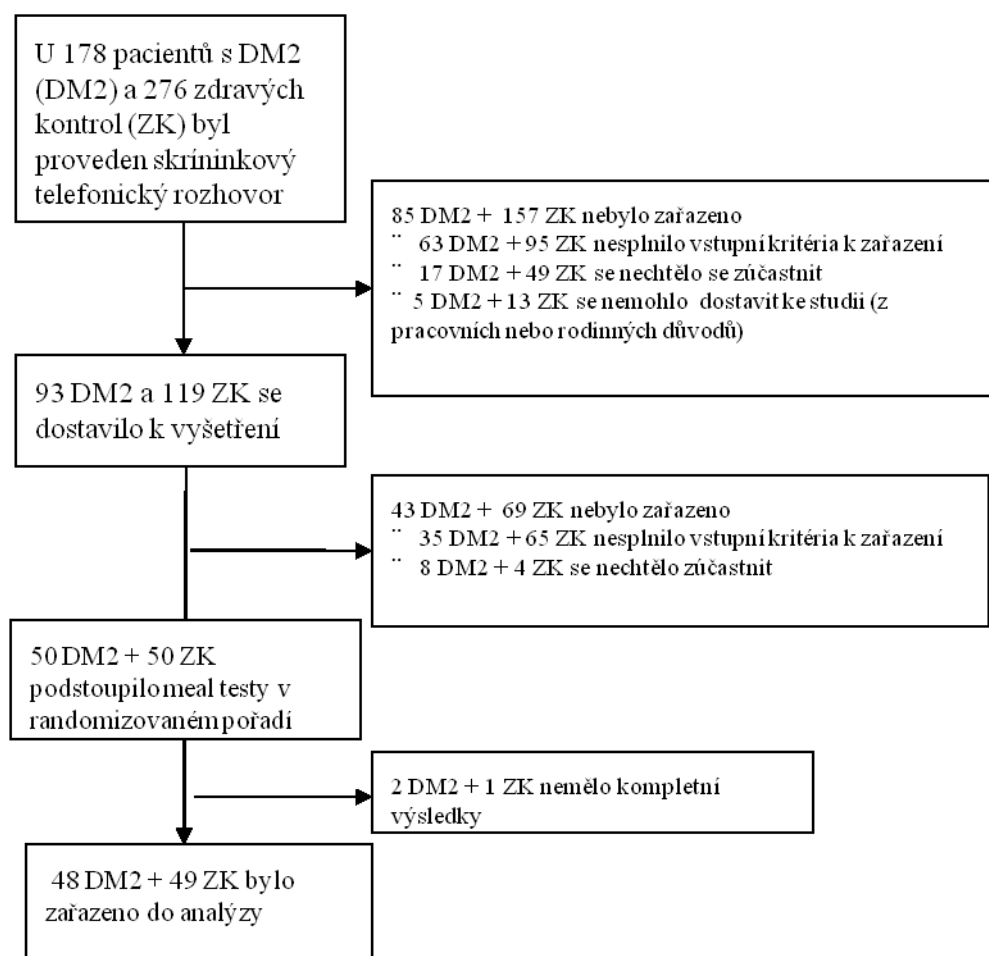
Charakteristika	Diabetici (n=50)	Kontroly (n=50)
Průměrný věk (roky)	56 ± 6	54 ± 8
Muži - No. (%)	23 (46)	23 (46)
Ženy - No. (%)	27 (54)	27 (54)
Kuřáci – No. (%)	11 (22)	7 (14)
Hmotnost (kg)	96,5 ± 17	71 ± 11
BMI (kg.m ⁻²)	33,3 ± 5,6	24,4 ± 2,5
Obvod pasu – cm	107 ± 13,0	85 ± 8,0
Obvod boků – cm	115 ± 12,0	98 ± 5,0
HbA1c – mmol/mol	53,7 ± 12,0	37,3 ± 2,7
Lačná glykémie – mmol/l	8,0 ± 3,1	5,0 ± 0,44
Trvání diabetu – roky	9,8 ± 6,3	

Tabulka 1: Charakteristika studijního souboru

2.1.2. Průběh studie

Účastníci byli v náhodném pořadí celkem 3x v cca týdenních intervalech podrobeni meal testu, při němž konzumovali tři různé snídaně se stejným energetickým obsahem (veganský sandwich; V-meal, hamburger; M-meal, nebo sýrovou bagetu; S-meal). Složení jednotlivých snídaní je podrobně popsáno v tabulce 2. Vždy po cca 10-12ti hodinovém lačnění.

Vzorky krve pro analýzu plasmy (koncentrace glukózy, imunoreaktivní inzulin, c-peptid, triglyceridy, volné mastné kyseliny, ukazatele oxidačního stresu a gastrointestinální a chuťové hormony) byly odebrány v čase 0 a za 30, 60, 120 and 180 minut po jídle.



Obrázek 3: Nábor pacientů do studie a její průběh

Studijní jídlo	Hamburger	Veganský sandwich	Sýrová bageta
Celkové množství (g)	150	235	180
Energetický obsah (kCal/kJ)	455/ 1904	456/ 1907	453/1895
Sacharidy (g)	31 (27%)	60 (52%)	49(44%)
Bílkoviny (g)	24 (21%)	13 (11%)	18(17%)
Lipidy (g)	26 (52%)	19 (37%)	19(38%)
Nasycené mastné kyseliny (g)	10 (38% z 52%)	6 (32% z 37%)	7 (37% z 38%)

Tabulka 2: Složení studijních jídel

2.1.3. Analytické metody

2.1.3.1. *Metabolické parametry:*

Glykémie ve venózní krvi byla vyšetřena glukózooxidázovou metodou analyzátozem Beckman Analyzer (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA), hladiny imunoreaktivního inzulinu radioimunologicky pomocí IMMUNOTECH Insulin IRMA kitu (IMMUNOTECH as, Praha, ČR), c-peptidu pomocí IMMUNOTECH C-Peptide IRMA kitu (IMMUNOTECH as, Praha, ČR). Koncentrace lipidů v plasmě byly stanoveny enzymatickými metodami (Roche, Basel, Switzerland).

2.1.3.2. *Gastrointestinální a chuťové hormony:*

Koncentrace hormonů: glucagon-like peptide-1 (GLP-1), gastric inhibitory peptide (GIP), pancreatic polypeptide (PP), peptide YY (PYY), leptin and ghrelin byly stanoveny v dubletech multiplex imunoanalýzou pomocí MILLIPLEX MAP Human Gut Hormone Panel (Millipore, Billerica, MA, USA) and a Luminex 100 IS analyzer (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) [Kellar and Iannone, 2002]. Výhodou multiplexového stanovení je, že vše proběhne během jednoho měření v jedné jamce pro všechny analyty stejně, tj. je jednoznačně vyšší porovnatelnost analytů mezi sebou než pokud se stanovují jeden po druhém.

Do vzorků krve byly po odběrech přidány inhibitory dipeptidyl peptidázy-4. Senzitivity kitu pro konkrétní peptidy stanovené výrobcem jako minimální detekovatelné koncentrace byly (v jednotkách pg/ml): ghrelin 1.8; leptin 157.2; GIP 0.2; GLP-1 5.2; PP 2.4; and PYY 8.4. Pro naše měření byla senzitivita vypočtena z nejmenší hodnoty koncentrace standardu: ghrelin 13.7; GIP 2.7; GLP-1 13.7; and PP 13.7. Pro ostatní analyty nebyly žádné hodnoty nižší než stanovený rozsah kalibrace.

2.1.3.3. *Markery oxidačního stresu:*

Parametry lipoperoxidace byly zhodnoceny podle koncentrací látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS) [Yokode et al., 1988]. Aktivita superoxiddismutázy (SOD) byla zhodnocena pomocí SOD testovacího kitu (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Sérová koncentrace kyseliny askorbové byla stanovena pomocí vysoko účinné kapalinové chromatografie (HPLC). Hladina redukovaného glutationu v krvi byla zjištěna pomocí HPLC diagnostického kitu pro glutation (Chromsystems, Munich, Germany).

2.1.4. Statistická analýza

Kalkulace počtu zařazených osob byla provedena na základě silové analýzy opakovaných měření pomocí statistického softwaru PASS 2005 (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT, USA). Pro statistickou analýzu jsme použili ANOVU s opakovaným měřením. Do modelu byly zahrnuty faktory „subject“, „group“, „meal“ a „time“ a jejich interakce mezi faktory „meal“ a „time“ (meal x time) a „group“ a „time“ (group x time). Data byla vyjádřena jako průměry \pm 95% konfidenční interval spolehlivosti. Pro zjištění případného „carry-over“ efektu jsme do statistického modelu přidali faktor „sequence“, pro který jsme nenašli statistickou významnost pro žádnou proměnnou.

2.2. Výsledky

Metabolická odpověď (sérové koncentrace glukózy, triglyceridů, volných mastných kyselin a ukazatele sekrece inzulinu (imunoreaktivní inzulin a c-peptid) na podání tří potravinových podnětů u zdravých kontrolních osob je znázorněna na **obrázku 4 (Figure 4)**. Průběh odpovědi na potravinové podněty u nemocných s DM2 jsou uvedeny na **obrázku 5**.

Koncentrace gastrointestinálních hormonů (ghrelin, leptin, GIP, GLP-1, amylin, PP, PYY) po třech potravinových podnětech u kontrolních osob jsou uvedeny na **obrázku 6** a u nemocných s diabetem na **obrázku 7**. Na **obrázcích 8 a 9** jsou znázorněny změny parametrů oxidačního stresu (TBARS, hladiny superoxid dismutázy, kyseliny askorbové a redukovaný glutation) po třech testovaných potravinových podnětech u zdravých kontrolních osob (**Obrázek 8**) a nemocných s diabetem (**Obrázek 9**).

Vzhledem k množství dat byly z důvodu přehlednosti výsledky rozděleny do dvou samostatných původních sdělení. (**Přílohy 1 a 2**) V příloze 1 jsou srovnány dva izokalorické potravinové podněty, a to vegetariánská snídane (s vysokým obsahem sacharidů) a McCountry sandwich (fast food hamburger s vysokým obsahem nasycených tuků). V příloze 2 jsou použity výsledky získané z meal testu s jídlem, jehož složení odpovídá standardním doporučením. Jako potravinovým podnět jsme zvolili sýrovou bagetu (S-meal).

2.2.1. *Metabolická odpověď (sérové koncentrace glukózy, triglyceridů, volných mastných kyselin a ukazatele sekrece inzulinu (imunoreaktivní inzulin a c-peptid)*

Sérové koncentrace glukózy, IRI, c-peptidu a lipidů byly významně vyšší u pacientů s diabetem po celou dobu testu (**Obrázek 10**). Vysokotuková snídane (M-meal) byla ve srovnání s vysokosacharidovou (V-meal) provázena vyšší postprandiální hladinou sérových

lipidů ($p<0,001$) u obou testovaných skupin. U diabetiků vedla navíc k perzistující posprandiální hyperinzulinémii. Plocha pod křivkou glukózy (AUC) byla srovnatelná po vysokotukové vs vysokosacharidové dietě ($10,6\pm 0,13$ vs $11,2\pm 0,15$ u zdravých kontrol; $21,58\pm 1,6$ vs $22,28\pm 1,7$ mmol/l.hod u DM), rozdíl byl pouze v maximální koncentraci (peak) glukózy, který byl logicky vyšší u snídaně bohaté na sacharidy ($p<0,01$).

2.2.2. Gastrointestinální hormony

Ve srovnání se zdravými kontrolami byly u pacientů s DM2 koncentrace většiny GIH významně vyšší ($p<0,001$). U zdravých osob vysokotuková snídaně více stimulovala sekreci vybraných GIH než snídaně vysokosacharidová (GIP: $p<0,001$; PYY: $p<0,05$; PP: $p<0,01$). Naproti tomu u nemocných s diabetem byla reakce GIH zcela opačná s vyšší koncentrací po vysokosacharidovém podnětu (GLP-1: $p<0,001$; GIP: $p<0,001$; PYY: $p<0,05$; PP: $p<0,05$). Největší rozdíly byly v sekreci GLP-1 a to jak v kvantitě, tak i v dynamice postprandiální odpovědi (**Obrázek 11**).

2.2.3. Chuťové hormony

Sérové koncentrace chuťových peptidů, ghrelinu a leptinu, se významně mezi oběma skupinami lišily, a to během celého meal testu (**Obrázek 11**). Koncentrace ghrelinu nalačno byla o 56% nižší ($p<0,001$) a leptinu o 150 % vyšší u pacientů s DM2 ve srovnání se zdravými kontrolami. Koncentrace leptinu se postprandiálně významně nezměnily, ani rozdíl mezioběma jídly nebyl patrný. Fyziologický pokles hladiny ghrelinu po jídle byl u pacientů s diabetem méně vyjádřený než u zdravých kontrol, kde byl výrazný pokles prvních 60 minut po jídle. Větší pokles jsme u této skupiny sledovali po M-meal ($p<0,001$). Doplnili jsme subanalýzu s faktorem „baseline ghrelin“, která měla za cíl zjistit vliv ghrelinu nalačno na jeho celkový pokles po jídle. Zjistili jsme, že čím je ghrelin nalačno vyšší, tím je větší i jeho pokles po jídle ($F=187$, $p=0,0001$).

2.2.4. Markery oxidačního stresu

Pacienti s DM2 měli nalačno vyšší ukazatele oxidačního stresu oproti zdravým kontrolám (**Obrázek 12**). Hladina TBARS byla vyšší o 67%, hladiny kyseliny askorbové, redukovaného glutationu a aktivity superoxid dismutázy byly významně nižší (o 5%, 13% a 48% postupně s $p<0,001$ pro všechny). Vysokotuková snídaně byla u nemocných s diabetem provázena vyšším vzestupem markerů oxidačního stresu (TBARS: $p<0,05$), které neměly příslušnou odezvu ve zvýšení aktivity superoxid dismutázy. V koncentracích redukovaného glutationu ani v hladinách kyseliny askorbové jsme nepozorovali žádné významné změny.

2.2.5. Metabolická odpověď a odpověď postprandiálních a chuťových hormonů po standardní snídani (S – meal)

Bazální i postprandiální koncentrace glukózy a inzulínu v plasmě byly významně vyšší u diabetiků. Koncentrace ghrelinu byly významně nižší u pacientů s DM2 po celou dobu testu.

Bazální i postprandiální koncentrace téměř všech ostatních GIH a látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou byly významně zvýšeny, zatímco kyselina askorbová, redukovaný glutathion a aktivita superoxid dismutázy byly nižší u pacientů s diabetem v porovnání se zdravými osobami.

2.2.6. Korelace

U nemocných s diabetem korelovaly meal testem indukované změny v koncentraci GIP pozitivně se změnami glykémie a imunoreaktivního inzulínu ($r=+0,52$; $p<0,001$ a $r=+0,54$; $p<0,001$) a změny v koncentraci PYY korelovaly pozitivně se změnami glykémie ($r=+0,47$; $p<0,01$). Změny v koncentracích GIP a PYY pozitivně korelovaly se změnami kyseliny askorbové ($r=+0,27$; $p<0,05$ a $r=+0,52$; $p<0,001$) (**Obrázek 13**).

Obrázek 4: Postprandiální změny v plasmatické koncentraci glukózy, lipidů a inzulinu u zdravých jedinců

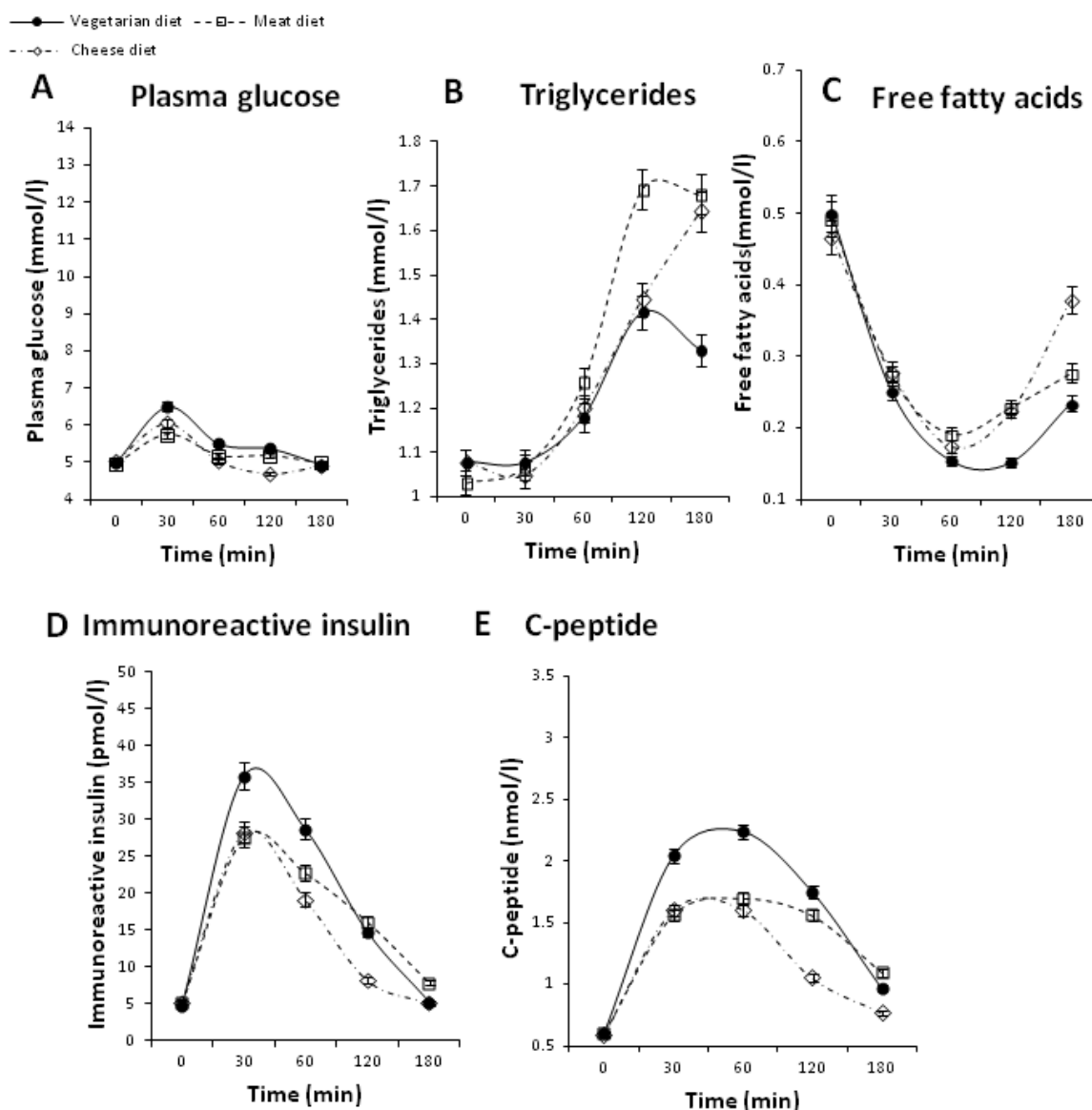


FIGURE 4: Postprandial changes in plasma concentrations of glucose, lipids and insulin in control subjects after ingestion of the vegetarian (closed circles, full line), cheese (open rhombus, dashed line) and the meat meal (open squares, dashed line). Data are expressed as mean with 95% CI. A: Plasma glucose: Factors diet $p < 0.001$, F-ratio 23.66, time $p < 0.001$, F-ratio 111.51; interaction diet \times time $p < 0.001$, F-ratio 12.32; B: Triglycerides: Factors diet $p < 0.001$, F-ratio 11.93; time $p < 0.001$, F-ratio 137.32; interaction diet \times time $p < 0.001$, F-ratio 61.48; C: Free fatty acids: Factors diet $p < 0.001$, F-ratio 27.11; time $p < 0.001$, F-ratio 204.79; interaction diet \times time $p < 0.001$, F-ratio 6.98; D: Immunoreactive insulin: Factors diet $p < 0.001$, F-ratio 39.14; time $p < 0.001$, F-ratio 783.33; interaction diet \times time $p < 0.001$, F-ratio 16.46; E: C-peptide: Factors diet $p < 0.001$, F-ratio 113.44; time $p < 0.001$, F-ratio 814.19; interaction diet \times time $p < 0.001$, F-ratio 28.86.

Obrázek 5: Postprandiální změny v plasmatické koncentraci glukózy, lipidů a inzulinu u pacientů s DM2

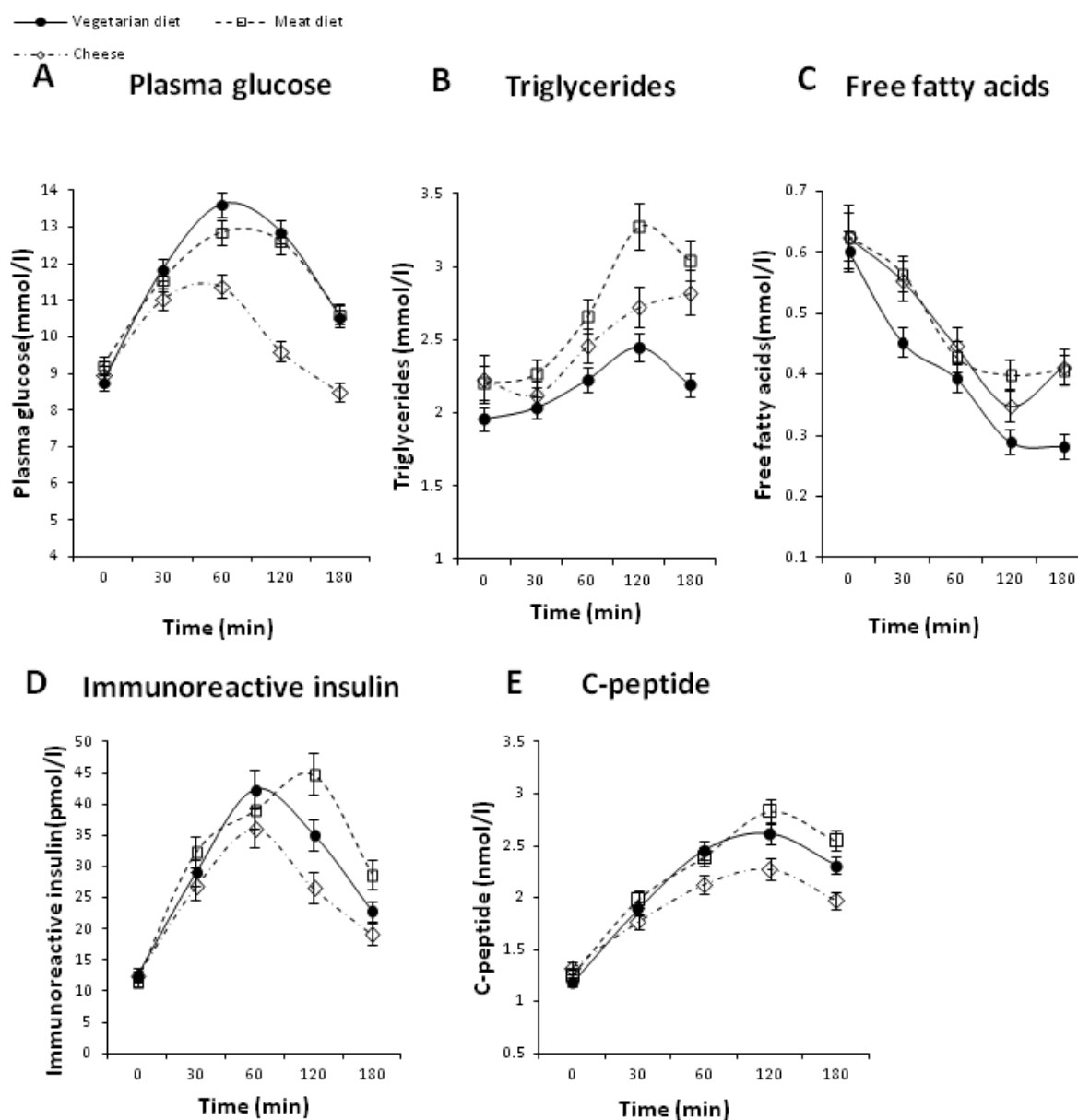


FIGURE 5: Postprandial changes in plasma concentrations of glucose, lipids and insulin in diabetic subjects after ingestion of the vegetarian (closed circles, full line), cheese (open rhombus, dashed line) and the meat meal (open squares, dashed line). Data are expressed as mean with 95% CI. A: Plasma glucose: Factors diet $p < 0.001$, F-ratio 44.42, time $p < 0.001$, F-ratio 74.26; interaction diet x time $p < 0.001$, F-ratio 62.42; B: Triglycerides: Factors time $p < 0.001$, F-ratio 20.95; diet $p < 0.001$, F-ratio 26.96; interaction diet x time $p = 0.001$, F-ratio 42.42; C: Free fatty acids: Factors diet $p < 0.001$, F-ratio 14.33; time $p < 0.001$, F-ratio 39.77; interaction diet x time $p < 0.001$, F-ratio 16.83; D: Immunoreactive insulin: Factors diet $p < 0.001$, F-ratio 7.9; time $p < 0.001$, F-ratio 102.15; interaction diet x time $p < 0.001$, F-ratio 56.43; E: C-peptide: Factors diet $p < 0.001$, F-ratio 11.53; time $p < 0.001$, F-ratio 144.24; interaction diet x time $p < 0.001$, F-ratio 145.62.

Obrázek 6: Postprandiální změny v plasmatické koncentraci gastrointestinálních hormonů u zdravých jedinců

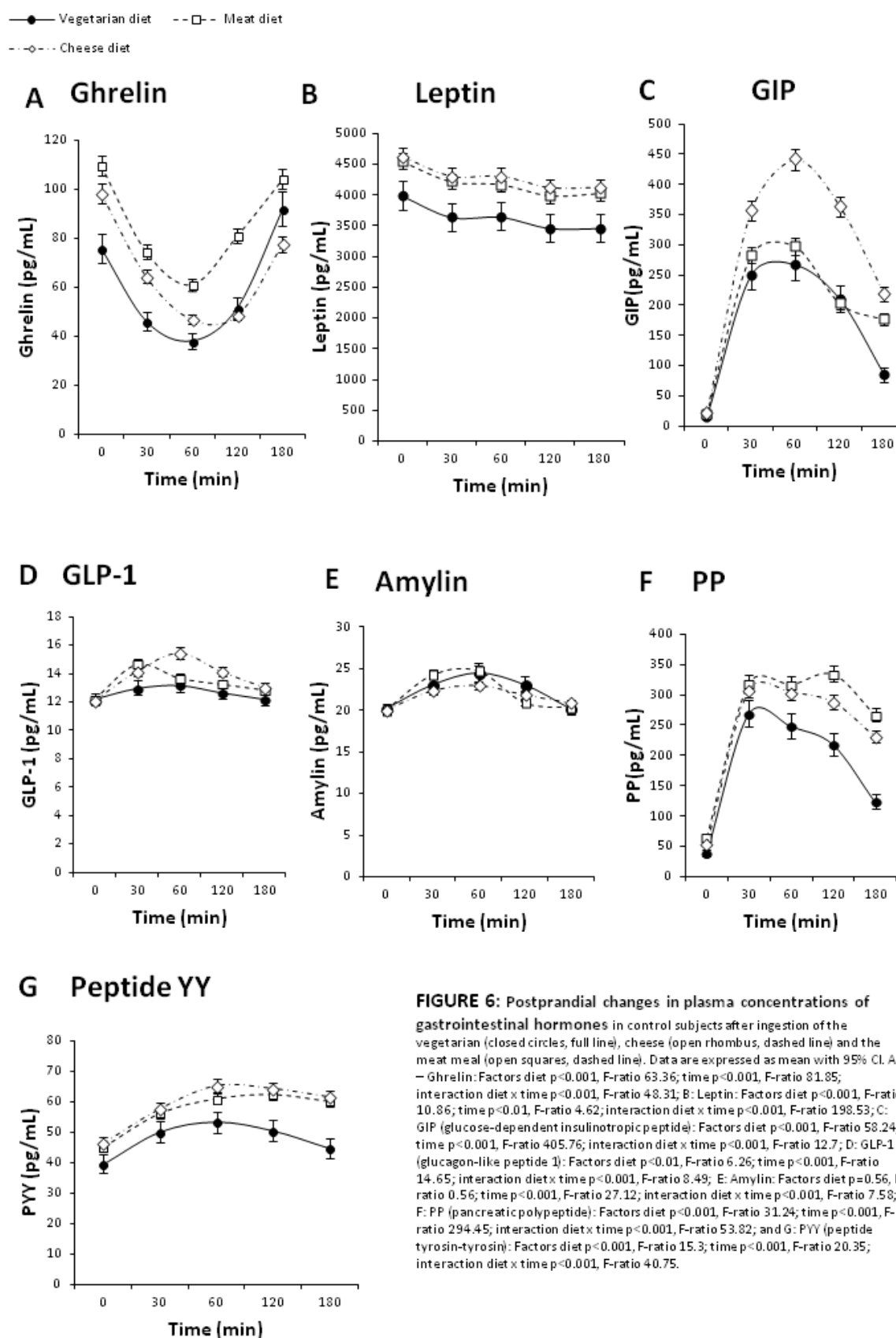
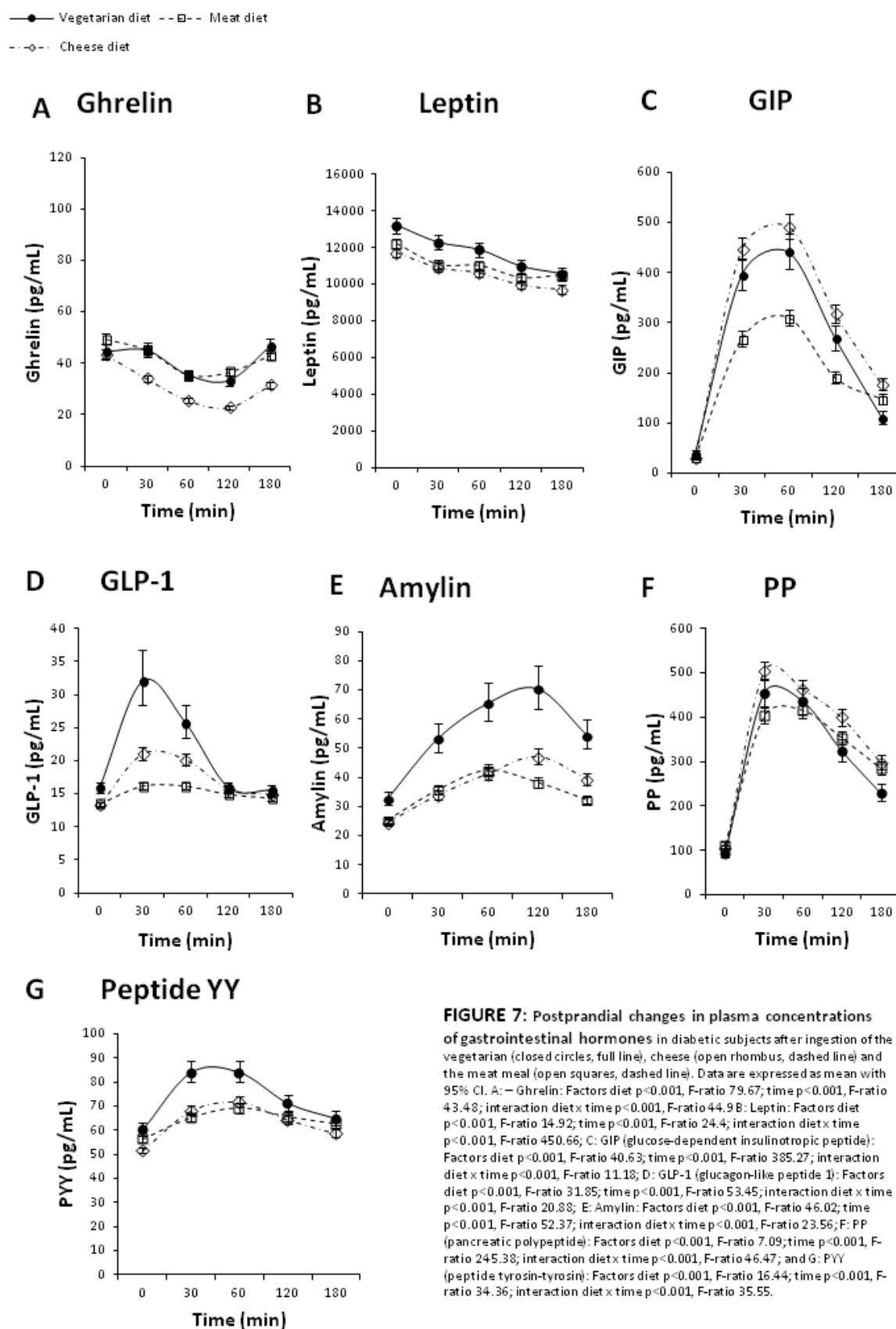


FIGURE 6: Postprandial changes in plasma concentrations of gastrointestinal hormones in control subjects after ingestion of the vegetarian (closed circles, full line), cheese (open rhombus, dashed line) and the meat meal (open squares, dashed line). Data are expressed as mean with 95% CI. A: Ghrelin: Factors diet $p < 0.001$, F-ratio 63.36; time $p < 0.001$, F-ratio 81.85; interaction diet \times time $p < 0.001$, F-ratio 48.31; B: Leptin: Factors diet $p < 0.001$, F-ratio 10.86; time $p < 0.01$, F-ratio 4.62; interaction diet \times time $p < 0.001$, F-ratio 198.53; C: GIP (glucose-dependent insulinotropic peptide): Factors diet $p < 0.001$, F-ratio 58.24; time $p < 0.001$, F-ratio 405.76; interaction diet \times time $p < 0.001$, F-ratio 12.7; D: GLP-1 (glucagon-like peptide 1): Factors diet $p < 0.01$, F-ratio 6.26; time $p < 0.001$, F-ratio 14.65; interaction diet \times time $p < 0.001$, F-ratio 8.49; E: Amylin: Factors diet $p = 0.56$, F-ratio 0.56; time $p < 0.001$, F-ratio 27.12; interaction diet \times time $p < 0.001$, F-ratio 7.58; F: PP (pancreatic polypeptide): Factors diet $p < 0.001$, F-ratio 31.24; time $p < 0.001$, F-ratio 294.45; interaction diet \times time $p < 0.001$, F-ratio 53.82; and G: PYY (peptide tyrosin-tyrosin): Factors diet $p < 0.001$, F-ratio 15.3; time $p < 0.001$, F-ratio 20.35; interaction diet \times time $p < 0.001$, F-ratio 40.75.

Obrázek 7: Postprandiální změny v plasmatické koncentraci gastrointestinálních hormonů u pacientů s DM2



Obrázek 8: Postprandiální změny v plasmatické koncentraci markerů oxidačního stresu u zdravých jedinců

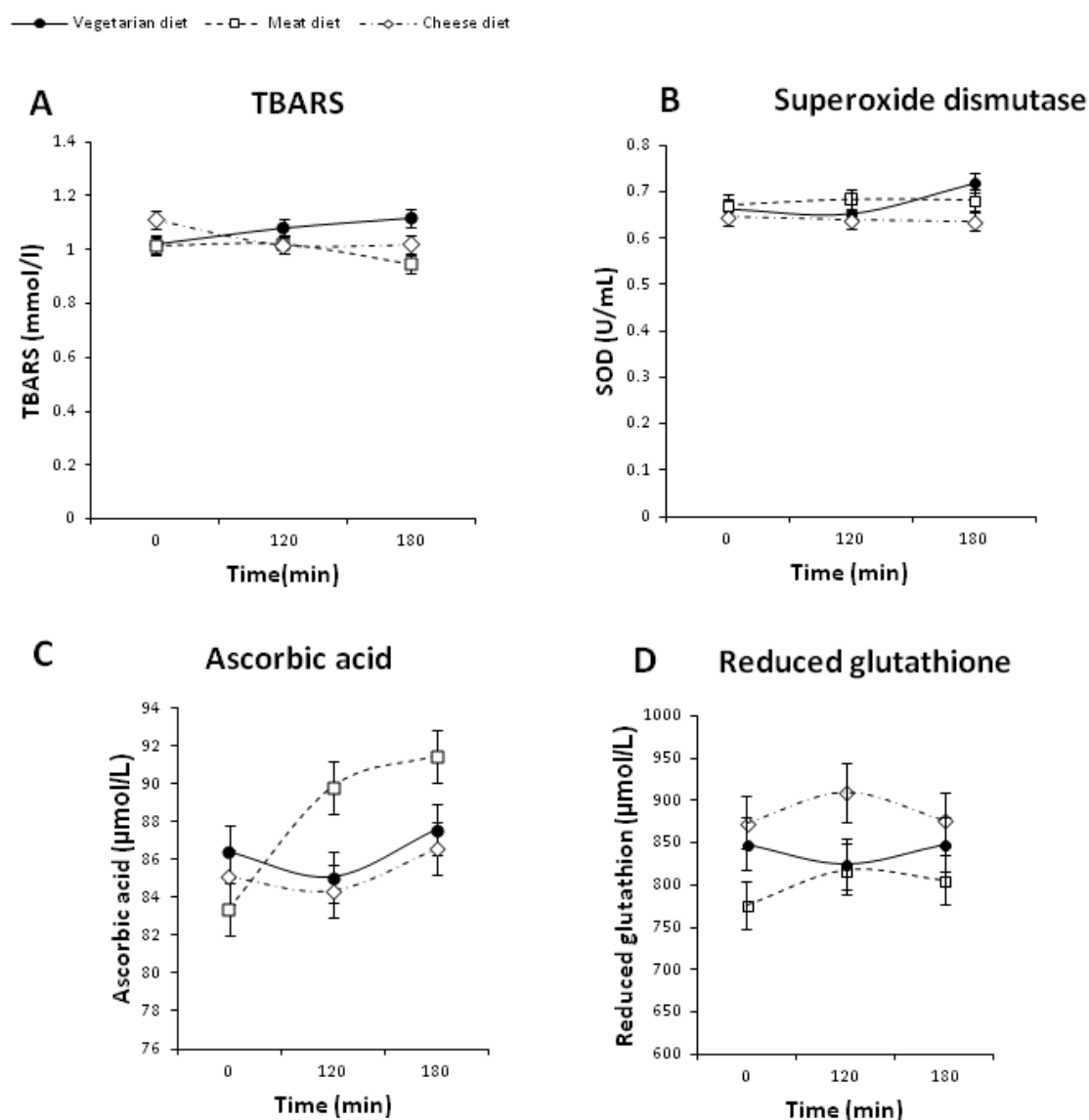


FIGURE 8: Postprandial changes in plasma concentrations of oxidative stress markers in control subjects after ingestion of the vegetarian (closed circles, full line), cheese (open rhombus, dashed line) and the meat meal (open squares, dashed line). Data are expressed as mean with 95% CI. A: TBARS: Factors diet $p < 0.05$, F-ratio 3.86, time $p = 0.77$, F-ratio 0.26; interaction diet \times time $p < 0.001$, F-ratio 19.88; B: Superoxide dismutase (SOD): Factors diet $p < 0.05$, F-ratio 3.17; time $p = 0.47$, F-ratio 0.76; interaction diet \times time $p < 0.001$, F-ratio 13.48; C: Ascorbic acid: Factors diet $p < 0.05$, F-ratio 3.27; time $p < 0.01$, F-ratio 4.91; interaction diet \times time $p < 0.001$, F-ratio 14.21; D: Reduced glutathione (GSH): Factors diet $p < 0.05$, F-ratio 5.83; time $p = 0.77$, F-ratio 0.26; interaction diet \times time, $p < 0.001$, F-ratio 19.88.

Obrázek 9: Postprandiální změny v plasmatické koncentraci markerů oxidačního stresu u pacientů s DM2

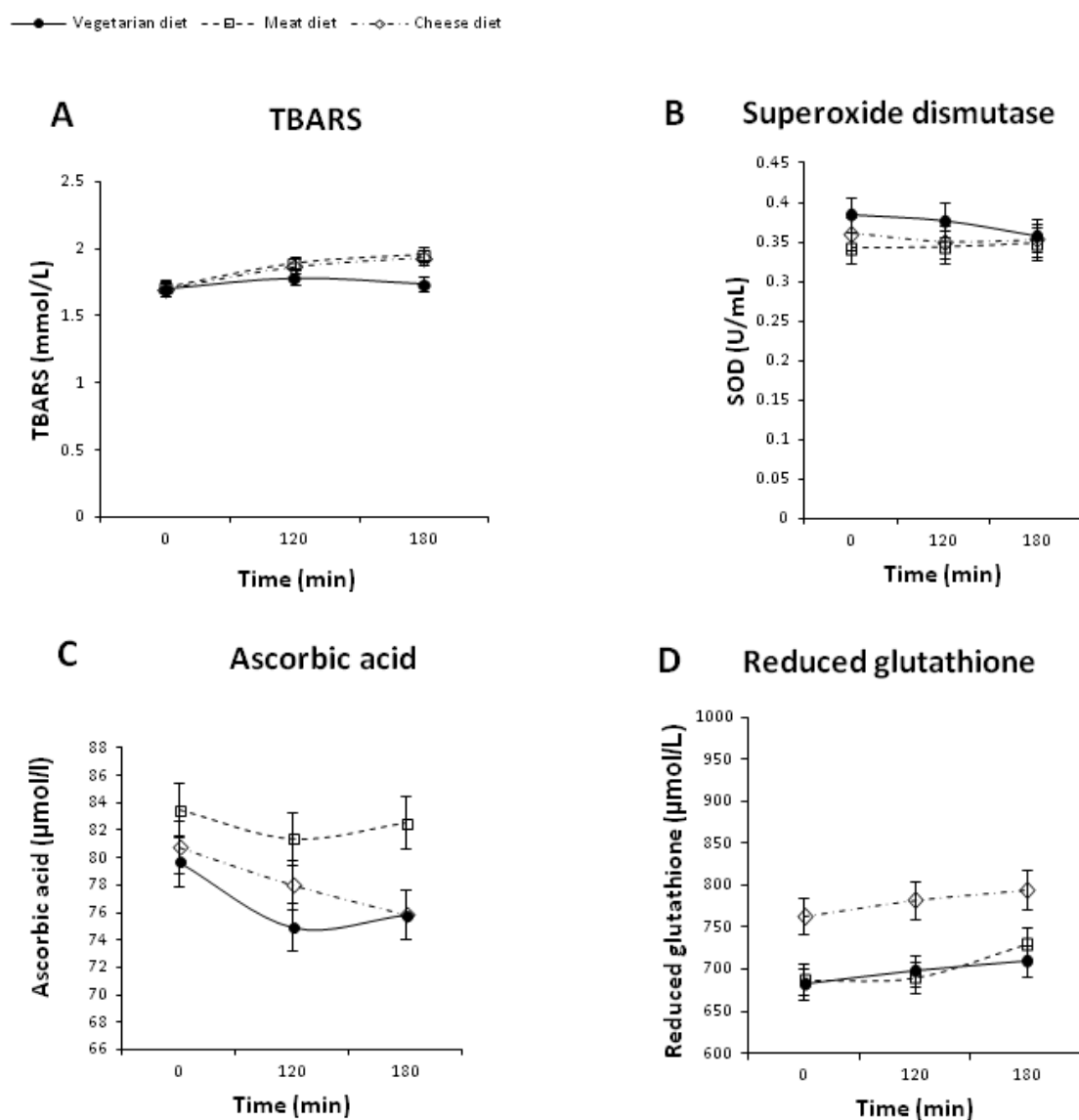


FIGURE 9: Postprandial changes in plasma concentrations of oxidative stress markers in diabetic subjects after ingestion of the vegetarian (closed circles, full line), cheese (open rhombus, dashed line) and the meat meal (open squares, dashed line). Data are expressed as mean with 95% CI. A: TBARS: Factors diet $p < 0.05$, F-ratio 3.75; time $p < 0.001$ F-ratio 8.64; interaction diet \times time $p < 0.001$, F-ratio 4.02; B: Superoxide dismutase (SOD): Factors diet $p = 0.25$, F-ratio 1.37; time $p = 0.86$, F-ratio 0.15; interaction diet \times time $p < 0.001$, F-ratio 6.62; C: Ascorbic acid: Factors diet $p < 0.001$, F-ratio 7.29; time $p = 0.053$, F-ratio 2.96; interaction diet \times time $p < 0.001$, F-ratio 9.27; D: Reduced glutathione (GSH): Factors diet $p < 0.001$, F-ratio 14.38; time $p = 0.13$, F-ratio 2.09; interaction diet \times time $p < 0.001$, F-ratio 12.37.

Obrázek 10: Postprandiální změny v plasmatické koncentraci glukózy, inzulínu, c-peptidu a lipidů u zdravých jedinců (HC) a pacientů s DM2 (T2D) po dvou dietách

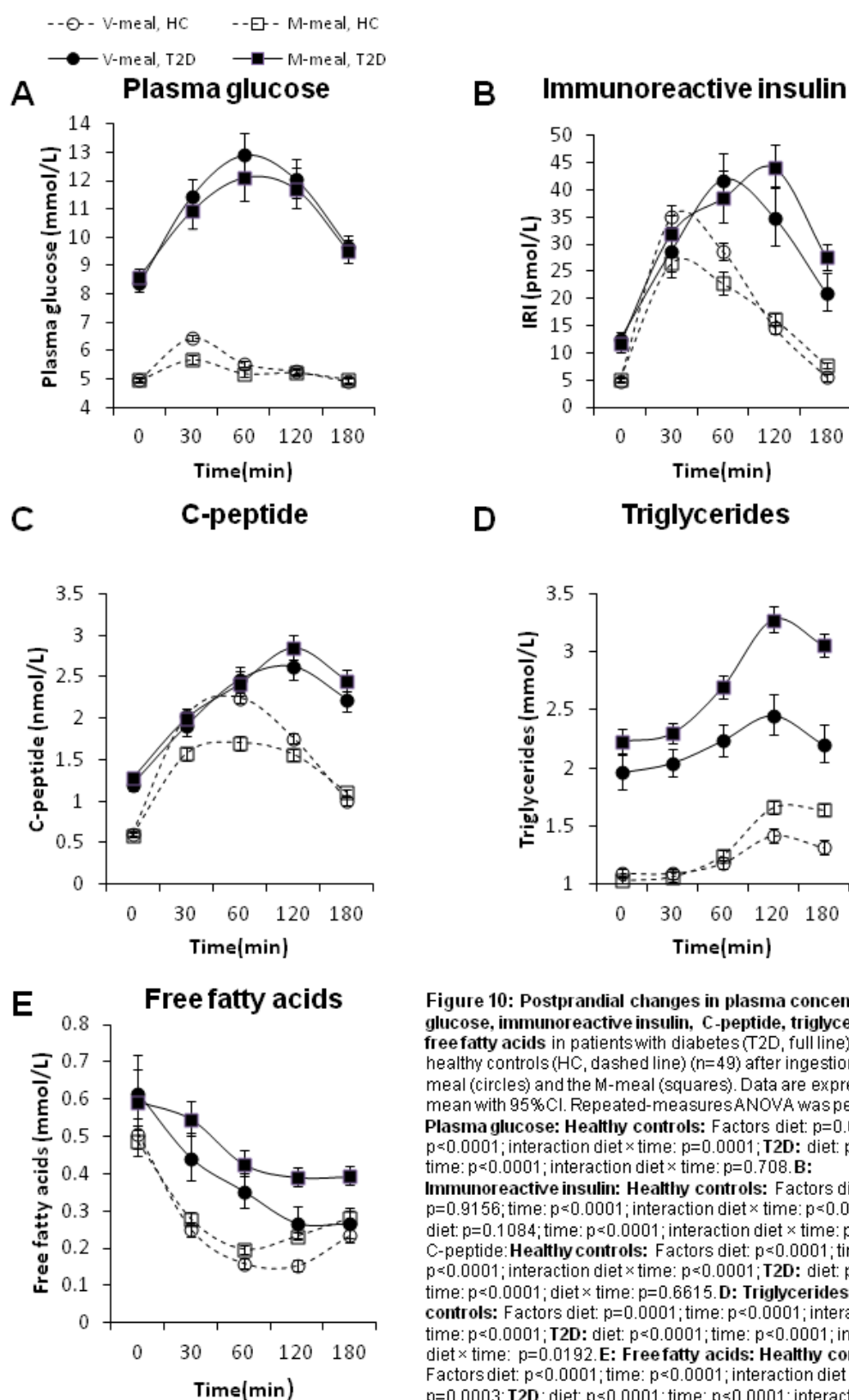


Figure 10: Postprandial changes in plasma concentrations of glucose, immunoreactive insulin, C-peptide, triglycerides and free fatty acids in patients with diabetes (T2D, full line) (n=48) and healthy controls (HC, dashed line) (n=49) after ingestion of the V-meal (circles) and the M-meal (squares). Data are expressed as mean with 95% CI. Repeated-measures ANOVA was performed. A: Plasma glucose: Healthy controls: Factors diet: $p=0.0001$; time: $p<0.0001$; interaction diet \times time: $p=0.0001$; T2D: diet: $p=0.3767$; time: $p<0.0001$; interaction diet \times time: $p=0.708$. B: Immunoreactive insulin: Healthy controls: Factors diet: $p=0.9156$; time: $p<0.0001$; interaction diet \times time: $p<0.0001$; T2D: diet: $p=0.1084$; time: $p<0.0001$; interaction diet \times time: $p=0.098$. C: C-peptide: Healthy controls: Factors diet: $p<0.0001$; time: $p<0.0001$; interaction diet \times time: $p<0.0001$; T2D: diet: $p=0.0713$; time: $p<0.0001$; diet \times time: $p=0.6615$. D: Triglycerides: Healthy controls: Factors diet: $p=0.0001$; time: $p<0.0001$; interaction diet \times time: $p<0.0001$; T2D: diet: $p<0.0001$; time: $p<0.0001$; interaction diet \times time: $p=0.0192$. E: Free fatty acids: Healthy controls: Factors diet: $p<0.0001$; time: $p<0.0001$; interaction diet \times time: $p=0.0003$; T2D: diet: $p<0.0001$; time: $p<0.0001$; interaction diet \times time: $p=0.058$.

Obrázek 11: Postprandiální změny v plasmatické koncentraci gastrointestinálních hormonů u zdravých jedinců (HC) a pacientů s DM2 (T2D) po dvou dietách

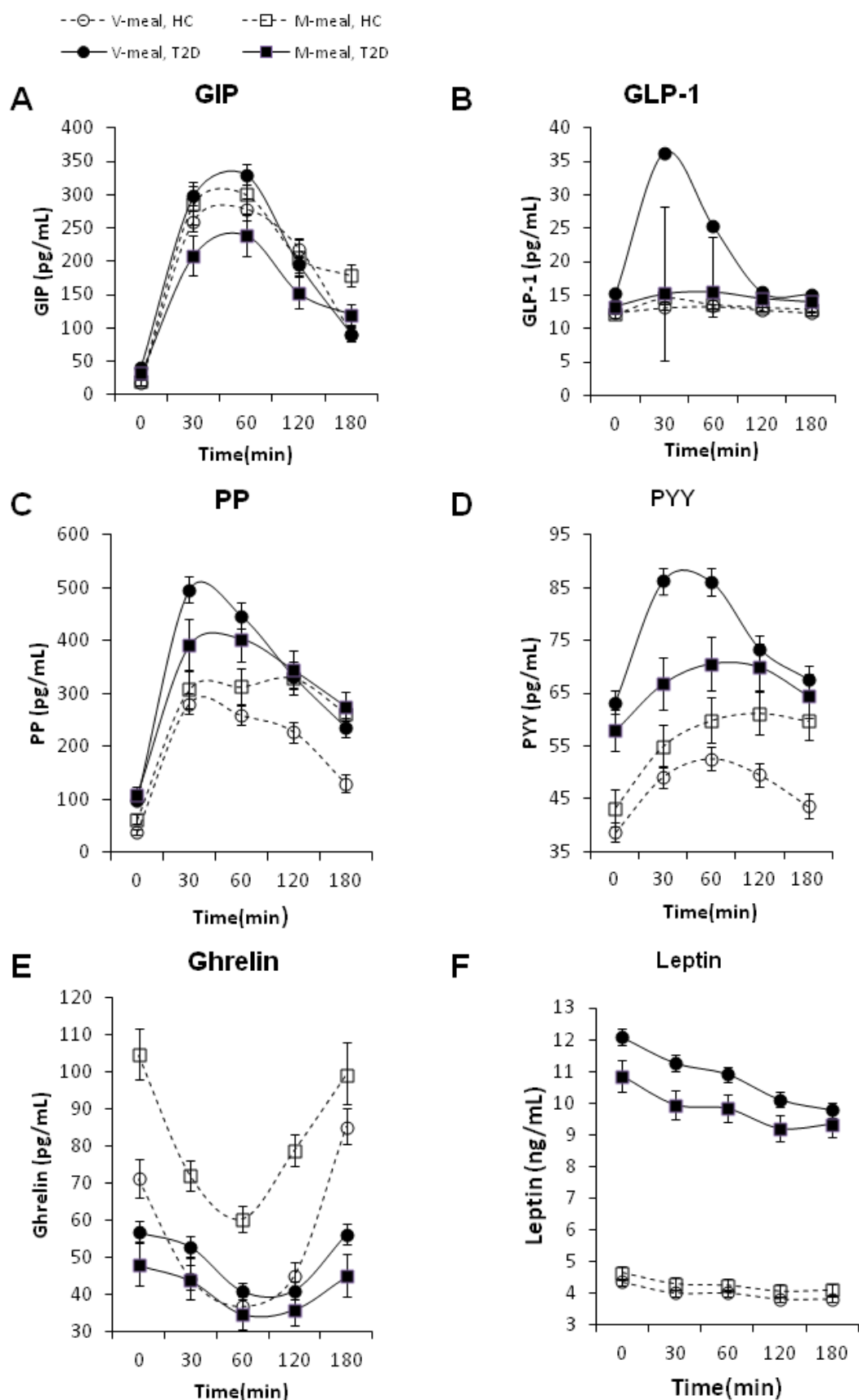


Figure 11: Postprandial changes in plasma concentrations of gastrointestinal and appetite hormones in patients with diabetes (T2D, full line) (n=48) and healthy controls (HC, dashed line) (n=49) after ingestion of the V-meal (circles) and the M-meal (squares). Data are expressed as mean with 95%CI. Repeated-measures ANOVA was performed. **A: GLP-1: Healthy controls:** Factors diet: $p=0.1072$; time: $p<0.0001$; interaction diet \times time: $p=0.2731$; **T2D:** diet: $p<0.0001$; time: $p<0.0001$; interaction diet \times time: $p<0.0001$. **B: GIP: Healthy controls:** Factors diet: $p=0.0128$; time: $p<0.0001$; interaction diet \times time: $p=0.0001$; **T2D:** diet: $p=0.0005$; time: $p<0.0001$; interaction diet \times time: $p<0.0001$. **C: PP: Healthy controls:** Factors diet: $p<0.0001$; time: $p<0.0001$; interaction diet \times time: $p=0.0016$; **T2D:** diet: $p=0.5702$; time: $p<0.0001$; interaction diet \times time: $p=0.0124$. **D: PYY: Healthy controls:** Factors diet: $p<0.0001$; time: $p<0.0001$; interaction diet \times time: $p=0.0768$; **T2D:** diet: $p<0.0001$; time: $p<0.0001$; interaction diet \times time: $p=0.004$. **E: Ghrelin: Healthy controls:** Factors diet: $p<0.0001$; time: $p<0.0001$; interaction diet \times time: $p=0.0004$; **T2D:** diet: $p=0.0002$; time: $p<0.0001$; interaction diet \times time: $p=0.9519$. **F: Leptin: Healthy controls:** Factors diet: $p=0.0019$; time: $p<0.0001$; interaction diet \times time: $p=0.9983$; **T2D:** diet: $p<0.0001$; time: $p<0.0001$; interaction diet \times time: $p=0.4988$.

Obrázek 12: Postprandiální změny v plasmatické koncentraci markerů oxidačního stresu u zdravých jedinců (HC) a pacientů s DM2 (T2D) po dvou dietách

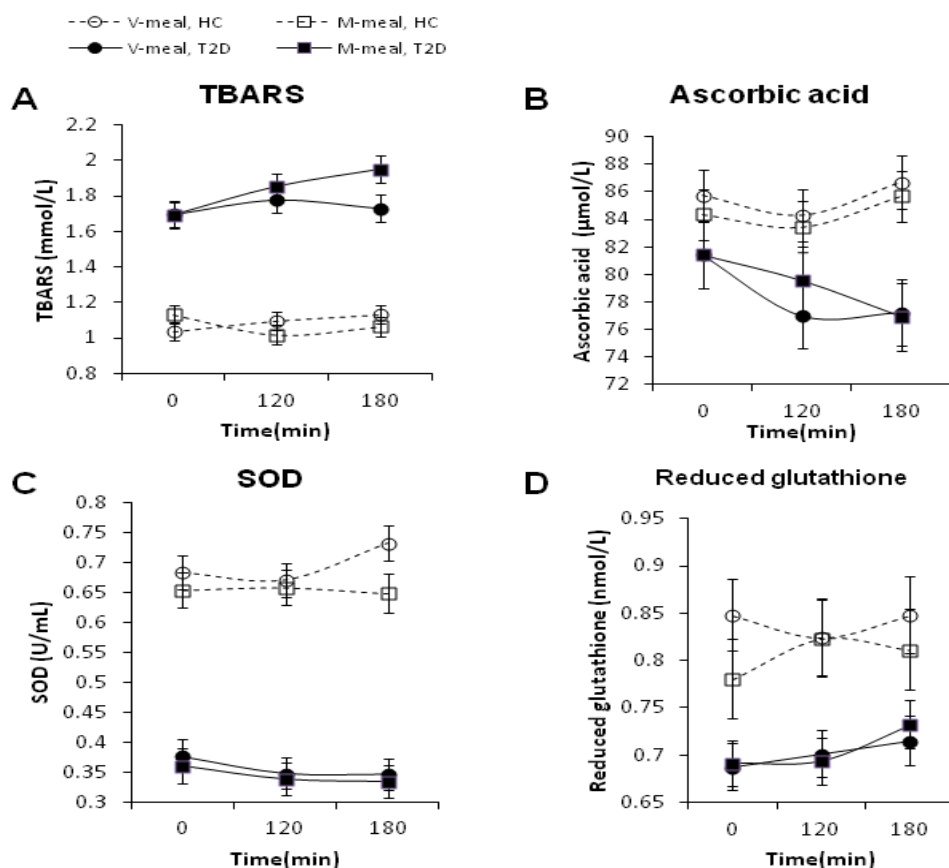
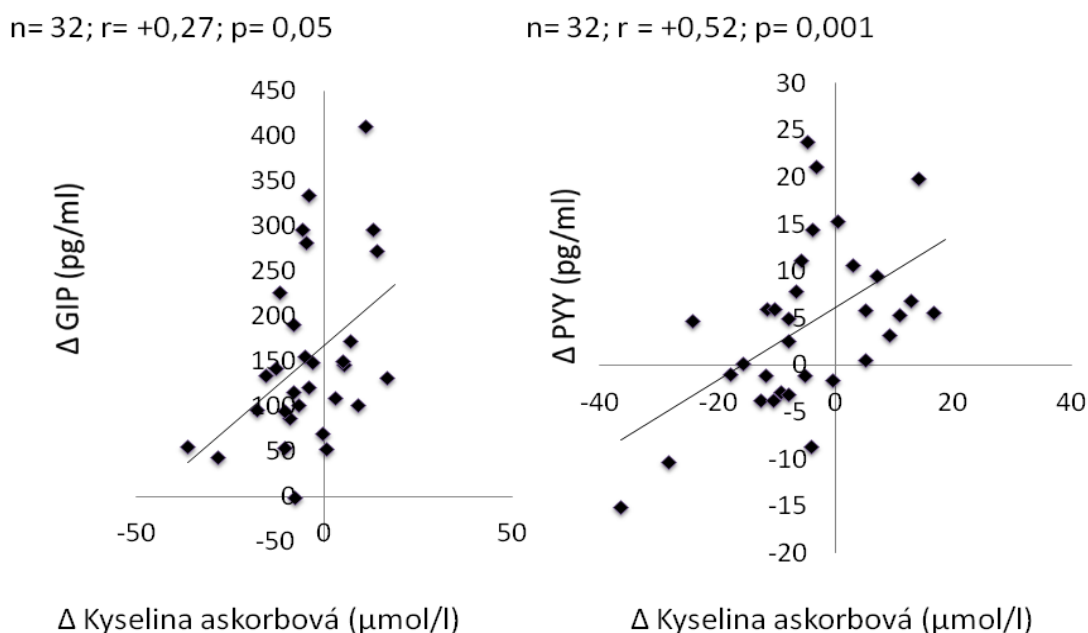


Figure 12: Postprandial changes in plasma concentrations of oxidative stress markers in patients with diabetes (T2D, full line) (n=45) and healthy controls (HC, dashed line) (n=49) after ingestion of the V-meal (circles) and the M-meal (squares). Data are expressed as mean with 95% CI. Repeated-measures ANOVA was performed. **A: TBARS: Healthy controls:** Factors diet: $p=0.5952$; time: $p=0.5647$; interaction diet \times time: $p=0.0405$; **T2D:** diet: $p=0.0317$; time: $p=0.0138$; interaction diet \times time: $p=0.113$. **B: Ascorbic acid: Healthy controls:** Factors diet: $p=0.3292$; time: $p=0.2324$; interaction diet \times time: $p=0.9802$; **T2D:** diet: $p=0.6016$; time: $p=0.0378$; interaction diet \times time: $p=0.6626$. **C: Superoxide dismutase: Healthy controls:** Factors diet: $p=0.0171$; time: $p=0.4608$; interaction diet \times time: $p=0.2388$; **T2D:** diet: $p=0.4312$; time: $p=0.2792$; interaction diet \times time: $p=0.9834$. **D: Reduced glutathione: Healthy controls:** Factors diet: $p=0.1504$; time: $p=0.8466$; interaction diet \times time: $p=0.5018$; **T2D:** diet: $p=0.7654$; time: $p=0.1475$; interaction diet \times time: $p=0.7935$.

Obrázek 13: Korelace mezi změnou koncentrace GIP a kyseliny askorbové a změnou koncentrace PYY a kyseliny askorbové



2.3. Diskuse

Doporučení pro dietní léčbu diabetiků se opírá o výpočet obsahu sacharidů [ADA, 2013]. Jedním ze standardně používaných edukačních modelů využívaných zejména při inzulinové léčbě je kalkulace výměnných jednotek. Naše výsledky naznačují, že dva potravinové podněty o stejném kalorickém obsahu s rozdílným obsahem sacharidů (M- a V-meal), byly provázeny srovnatelným vzestupem glykémie po jídle. V prvních 180 minutách po jídle se křivky sledující postprandiální glykémii lišily pouze v maximální koncentraci (peak) glukózy, který byl logicky vyšší u snídaně bohaté na sacharidy. Existují doklady pro to, že postprandiální metabolická odpověď je významně modifikována obsahem dalších makronutrientů, tuků a bílkovin, které tak mohou ovlivnit i vzestup glykémie po jídle u zdravých jedinců [Nuttall et al., 1985] a u pacientů s DM1 [Peters and Davidson, 1993] nebo DM2 [Estrich et al., 1967]. Je dobře známo, že volné mastné kyseliny snižují inzulinovou senzitivitu a umocňují v játrech produkci glukózy [Savage et al., 2007]. Intervenční studie dokazují, že při poklesu sérových koncentrací volných mastných kyselin dochází ke zlepšení tkáňové senzitivity k inzulinu a zvýšení tolerance k zátěži glukózou [Bajaj et al., 2004]. Vysokotuková snídaně byla ve

srovnání s vysokosacharidovou provázena vyšší postprandiální hladinou sérových lipidů u obou testovaných skupin (tj. diabetiků i kontrol), u diabetiků vedla navíc k perzistující posprandiální hyperinzulinémii. To je v souladu se studií, která během clampového vyšetření trvajících několik hodin dokázala škodlivý vliv FFA na inzulinovou senzitivitu [Gormsen et al., 2011]. U pacientů s DM1 bylo jídlo s větším obsahem bílkovin a/nebo tuků provázeno zvýšenou spotřebou inzulínu k jídlu [Wolpert et al., 2013] [Peters and Davidson, 1993]. Sacharidy, tuky a bílkoviny vedou k sekreci široké škály GIH [Tolhurst et al., 2012]. Inkretinový efekt, neboli zvýšení sekrece inzulínu po jídle vlivem účinku GIH, je přisuzován účinku dvou gastrointestinálních hormonů – GIP a GLP-1. U zdravých jedinců se inkretinový efekt podílí na celkové postprandiální sekreci inzulínu až v 70 -ti % [Nauck et al., 1986]. U pacientů s DM2 dochází ke snížení inkretinového efektu a k této poruše dochází s velkou pravděpodobností sekundárně [Knop et al., 2007] vlivem snížené senzitivity β -buněk pankreatu k účinku GLP-1 a GIP [Kjems et al., 2003]. Patofyziologický podklad této snížené senzitivity se přesně nezná, ale pravděpodobně dochází k desenzitizaci receptorů vlivem hyperglykémie a hyperlipidémie [Kang et al., 2013]. Studie, které sledovaly vliv makronutrientů na sekreci GIP a GLP-1 po jídle, nemají ustálené závěry. Podle jedné studie dochází k větší sekreci GIP po složeném potravinovém podnětu, než po samotné glukóze při orálním glukózovém testu [Vollmer et al., 2008]. Dále bylo zjištěno, že tuk stimuluje hlavně sekreci GIP, kdežto pro stimulaci sekrece GLP-1 jsou důležité hlavně sacharidy [Rijkeljkhuizen et al., 2010]. Bílkoviny mají na sekreci GLP-1 a GIP různorodý vliv [Carr et al., 2008] [Carrel et al., 2011]. U pacientů s DM2 byla popsána porucha v odpovědi GLP-1 po příjmu potravy bohaté na tuk, což by mohlo naše zjištění částečně vysvětlovat [Fernandez-Garcia et al., 2014].

Zjistili jsme, že reakce GIH byla zcela opačná u pacientů s DM2 než u zdravých kontrol. U zdravých jedinců byla vyšší koncentrace GIH patrná po snídani s vyšším obsahem tuku a bílkovin, u pacientů s DM2 po potravinovém podnětu s vyšším obsahem sacharidů.

Z našich výsledků je zřejmé, že pro pacienty s DM2 představují sacharidy nejsilnější stimulus pro sekreci GLP-1 a GIP, na rozdíl od zdravých jedinců, kteří mají významně vyšší sekreci GLP-1, GIP, PYY a PP po složeném potravinovém podnětu s větším množstvím bílkovin a tuků.

Dále jsme potvrdili, že pacienti s DM2 mají vyšší sérové koncentrace GLP-1 a GIP než zdraví jedinci, což dokládá i nedávno publikovaná rozsáhlá metaanalýza [Calanna et al., 2013]. Avšak u pacientů s delším trváním choroby a špatnou kompenzací jsou zjišťovány častěji i nižší koncentrace tohoto hormonu [Vilsboll et al., 2001].

Je známá celá řada gastrointestinálních peptidů podílejících se na regulaci energetického příjmu, chuti k jídlu a celkové energetické homeostázy u člověka. Jejich sekrece je modulována mimo jiné i příjmem potravy. PYY se tvoří v enteroendokrinních L-buňkách společně s GLP-1 [Kim et al., 2005]. K produkci PP dochází v endokrinních buňkách pankreatu. Po intravenózním podání obou hormonů, dochází u zdravých jedinců ke snížení pocitů hladu a snížení příjmu potravy [Batterham et al., 2003]. Mezi makronutrienty stimuluje jejich sekreci nejvíce tuk. A to hlavně během trávení v přítomnosti volných mastných kyselin v tenkém střevě [Feinle-Bisset et al., 2005].

I v naší studii jsme větší sekreci obou peptidů sledovali u zdravých jedinců po M-meal. V této skupině, na rozdíl od diabetiků, byla zachována i dvoufázová sekrece PYY. Sekrece PYY se fyziologicky skládá ze dvou fází. První vzestup je zprostředkován nejspíše stimulací autonomního nervového systému a další růst přímým kontaktem tráveniny v tenkém střevě [Adrian et al., 1985]. Existují doklady pro to, že inzulinová rezistence a zvýšená glykémie snižují odpověď PYY na tuk v potravě [Fernandez-Garcia et al., 2014]. U pacientů s diabetem chybí iniciální zvýšení sekrece PYY po jídle, což může být způsobeno přítomností autonomní neuropatie tenkého střeva [English et al., 2006]. Sníženou sekreci PP po potraviném podnětu bohatém na tuk u diabetiků dosud nikdo nepopsal.

Ghrelín je orexigenní peptid, stimulující chuť k jídlu a zvyšující příjem potravy. U zdravých jedinců se jeho sérová koncentrace při lačnění zvyšuje a je snížena při příjmu potravy [Wren et al., 2000]. První hodinu po jídle jsme u zdravých jedinců pozorovali výrazný pokles koncentrací ghrelínu, větší po M-meal. Podle předešlé studie je pro pokles ghrelínu důležitá hlavně přítomnost tuku v jídle [Feinle-Bisset et al., 2005]. Zjistili jsme, že čím je bazální koncentrace ghrelínu větší, tím je větší i pokles ghrelínu po jídle. U naší skupiny pacientů s diabetem byly nižší hladiny ghrelínu nalačno a po jídle u nich nedošlo k fyziologickému poklesu. Mezi oběma jídly nebyl pozorován žádný rozdíl. Postprandiální stav je u pacientů s DM2 charakterizován zvýšenou hladinou glykémie, lipidů a také markerů oxidačního stresu [Ceriello et al., 2011].

V naší skupině pacientů s DM2 jsme sledovali významně zvýšené hladiny všech ukazatelů zvýšeného oxidačního stresu a snížené hladiny antioxidantů. Zvýšený oxidační stres hraje roli při manifestaci diabetu a progresi jeho komplikací [Ceriello and Motz, 2004]. Důležitým faktorem se zdá být kvalita tuku v potravě. Zvýšený příjem nasycených mastných kyselin přirozeně se vyskytující v mase, hlavně v masných výrobcích, zvyšuje riziko vzniku diabetu [Feskens et al., 1995] [Maron et al., 1991]. Intervenční studie, které sledovaly pacienty s metabolickým syndromem, doložily, že zvýšený příjem nasycených mastných kyselin vede

ke zvýšenému oxidačnímu stresu [Perez-Martinez et al., 2010] [Cardona et al., 2008]. V naší studii jsme po jídle s větším obsahem tuků (M-meal) sledovali vyšší hladiny TBARS – ukazatele lipoperoxidace. Mohlo to být způsobené i formou přípravy hamburgeru, který se smažil při vysoké teplotě. Podle studií vzniká nejvíce produktů lipoperoxidace právě přípravou masných pokrmů bohatých na nasycené mastné kyseliny smažením [Li et al., 2010] [Runchey et al., 2013]. V naší studii jsme si vybrali testovat dvě jídla, která se vyskytují běžně v jídelníčku - populární hamburger a veganský sandwich. Hamburger obsahoval nejen vyšší množství tuku, ale i bílkovin, nemůžeme tedy efekt obou makronutrientů od sebe oddělit. Další limitací naší studie je vyšší hmotnost pacientů s diabetem, která mohla ovlivnit některé sledované proměnné. A nakonec, krátké trvání našeho testu (3 hodiny) mohlo vést k podhodnocení výsledků, protože nedošlo k úplné absorpci makronutrientů.

Postprandiálně dochází v plasmě ke zvýšení koncentrace glukózy a lipidů. U pacientů s DM2 je hyperglykémie a hyperlipidémie provázena zvýšeným oxidačním stresem [Monnier et al., 2006] a poruchou účinku gastrointestinálních peptidů [Poitout, 2013]. Případná souvislost mezi GIH a zvýšeným oxidačním stresem nebyla studována nebyla studována. Cílem naší studie bylo sledovat změny v postprandiální sekreci GIH společně se stanovením změn markerů oxidačního stresu.

Naše data potvrdila, že nemocní s DM2 mají postprandiálně vyšší oxidační stres a vyšší koncentrace většiny GIH v porovnání se zdravými kontrolami. Zjistili jsme, že u pacientů s DM2 postprandiální změny GIP a PYY pozitivně korelují se změnami koncentrace kyseliny askorbové. Prvotní porucha by se mohla vyskytovat na úrovni snížené odpovědi L- a K-buněk tenkého střeva, vedoucí k vyšší glykémii a vyššímu oxidačnímu stresu, nebo zvýšený oxidační stres po jídle mohl vést k poruše těchto buněk. Jako další možnost se nabízí, že obě abnormality nemají žádnou kauzální souvislost. Ke zvýšení kyseliny askorbové mohlo u pacientů s DM2 dojít i vlivem zvýšené glykémie, jelikož pro vstup do buňky využívají kyselina askorbová a glukóza stejnou cestu, a tak postprandiální vzestup koncentrace glukózy inhibuje odsun kyseliny askorbové do buněk [Padh et al., 1985]. To se ukazuje jako patofyziologicky výhodný děj, protože kyselina askorbová může ochraňovat endoteliální buňky před zvýšeným oxidačním stresem vzniklým zvýšenou hladinou glukózy a lipidů [Anderson et al., 2006].

Dále jsme pozorovali souvislost mezi změnami koncentrací amylinu, c-peptidu a IRI. Amylin je peptid, který se uvolňuje společně s inzulínem z β -buněk pankreatu. Jsou doklady pro to, že se spolupodílí s jinými gastrointestinálními hormony (PYY a GLP-1) na řízení

příjmu potravy [Lutz, 2013]. Vzájemná souvislost mezi změnami koncentrací amylinu a TAG už byla v literatuře dříve popsána [Hou et al., 2011].

Přímá asociace mezi změnami GIH a oxidačním stresem nebyla průkazná (vyjma pozitivní korelace mezi změnami GIP a PYY se změnami koncentrace kyseliny askorbové ve skupině pacientů s DM2). Snížený účinek gastrointestinálních hormonů a zvýšený oxidační stres po jídle jsou u pacientů s DM2 pravděpodobně dva nezávislé patofyziologické děje.

3. Studie B: Vliv frekvence jídel na inzulínovou rezistenci, sekreci inzulinu a střevních hormonů a jaterní steatózu u pacientů s diabetem 2. typu. (Přílohy 3-6)

3.1. Metodika

3.1.1. Design studie a soubor účastníků

Randomizovaná překřížená studie testovala dva jídelní režimy: šest jídel a dvě jídla denně s obdobnou kalorickou restrikcí (-500 kcal/den). Každá perioda daného jídelního režimu trvala tři měsíce. Skrínkem prošlo 219 osob s DM2, z nichž vyřazeno bylo 165 osob (112 nesplnilo zařazovací kritéria a 53 osob odmítlo účast ve studii). Zařazeno a randomizováno bylo celkem 54 nemocných s DM2, léčených dietou nebo perorálními antidiabetiky, s trváním diabetu nejméně jeden rok, ženy i muži, ve věku 30-65 let, s BMI 27-50 kg/m². Polovina účastníků započala studii režimem 6 jídel denně (režim A6) a 27 osob začalo režimem se dvěma jídly denně (režim B2). Po 3 měsících se dietní režimy vyměnily (**Obrázek 14**).

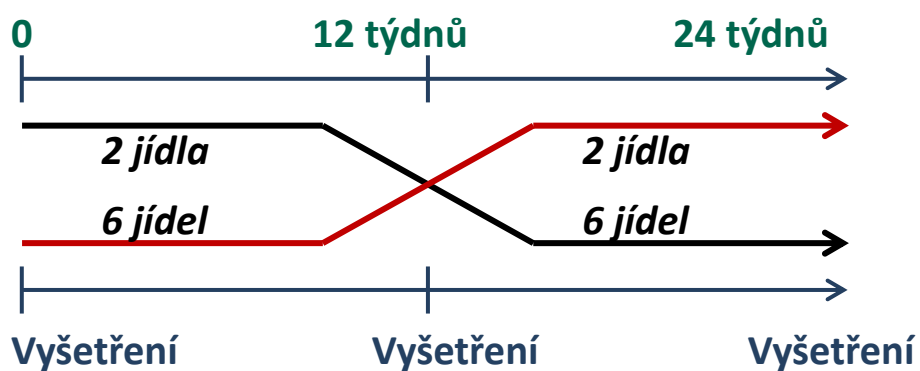
Charakteristika zařazených osob a průběh studie jsou uvedeny v **tabulce 3** a na **obrázku 15**.

3.1.2. Průběh studie

Jídelní režimy: Při režimu šesti jídel za den byli účastníci požádáni, aby rozdělili svůj celkový kalorický příjem do šesti jídel a aby jedli každé dvě až tři hodiny. Pro polovinu účastníků byla všechna jídla během celé studie zajištěna. Druhá polovina účastníků byla důkladně edukována ohledně zachování kalorického příjmu při obou režimech. Jídla si nemocní připravovali sami. Při režimu dvou jídel za den rozdělili účastníci studie svůj celkový kalorický příjem do dvou jídel: první jídlo jedli mezi 6. a 10. hodinou dopoledne a druhé jídlo mezi 12. a 16. hodinou. Kvalita života byla zjišťována pomocí 2 dotazníků: Weight-Loss Quality-of-Life (OWLQOL) a Weight-Related Symptoms (WRSM). Použili jsme Trífaktorový dotazník k monitorování

změn v jídelním chování a Beckův dotazník ke kvantifikaci vyhledání depresivních symptomů. Účastníci studie vyplňovali na konci každého dietního režimu jídelníček (dva všední a jeden víkendový den). Všichni účastníci byli vyšetřeni v týdnech 0, 12 a 24.

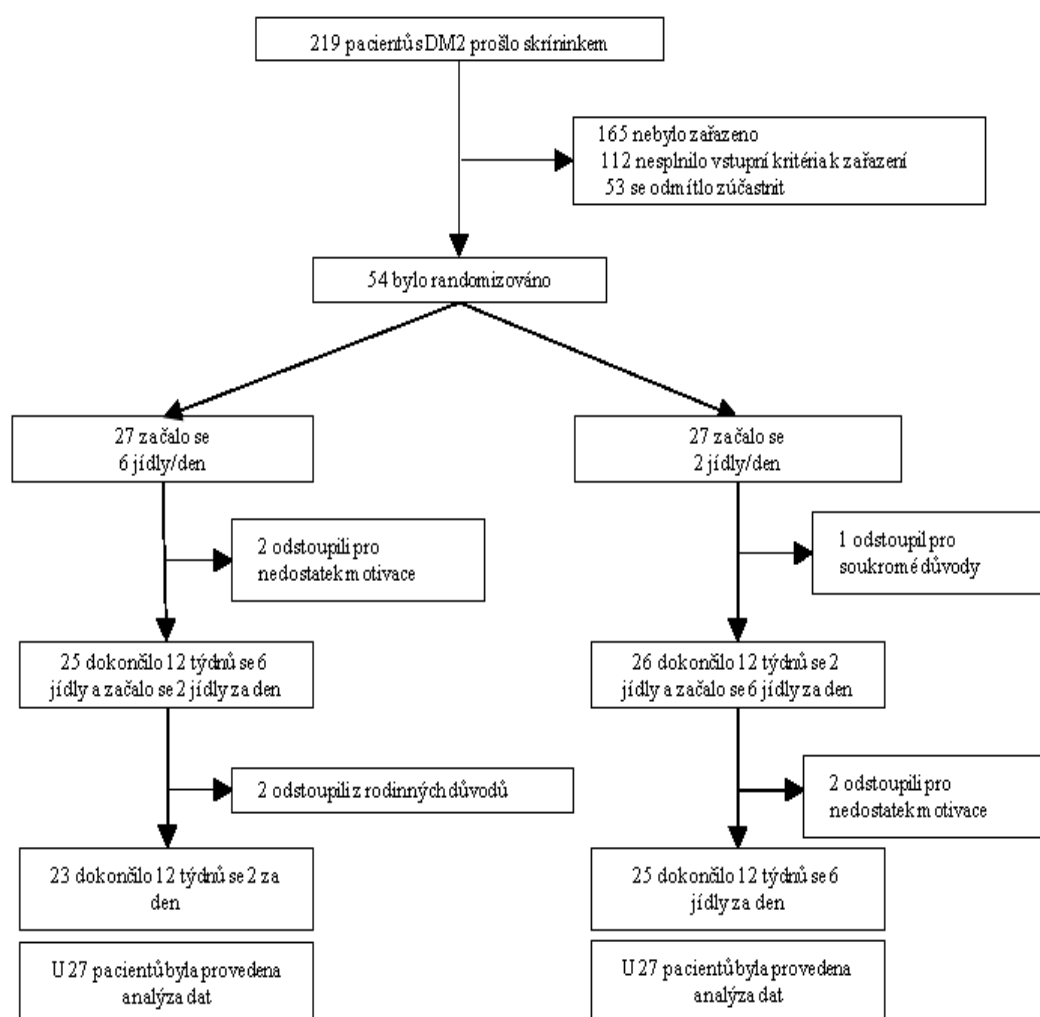
Obrázek 14: Design studie



Tabulka 3: Charakteristika souboru

Základní charakteristika	Soubor (n=54)
Věk - let	59.4±7.0
Pohlaví - počet (%)	
Muži	29 (54)
Trvání diabetu – let	8.1±5.8
Kuřáci - počet (%)	10 (19)
Váha - kg	94.1±15.5
BMI - kg.m ⁻²	32.6±4.9
HbA1c (IFCC) - mmol/mol	54.9±13.0

Obrázek 15: Průběh studie



Pohybový režim: Účastníci neměnili své pohybové návyky během studie. Fyzická aktivita byla sledována za použití krokoměrů a standardizovaných dotazníků: IPAQ (International Physical Activity Questionnaire) a Baeckeho dotazníku habituální pohybové aktivity.

Vyšetření: Na začátku studie (týden 0) a po každých 3 měsících intervence (týden 12 a 24) byla provedena následující vyšetření (u každého jedince celkem 3x):

- a) Běžná antropometrická vyšetření (hmotnost, BMI, obvod pasu a boků) a odběry krve pro běžná laboratorní vyšetření, zhodnocení metabolismu glukózy a lipidů, stanovení koncentrací vybraných adipokinů, střevních hormonů, markerů oxidačního stresu, vitaminů, složení mastných kyselin ve fosfolipidech séra (viz. Analytické metody).
- b) Meal test pro stanovení glukózové tolerance a sekrece inzulínu po standardní snídani /bageta Crocodile Sýrový mlsoun - 180g, energie 452,8 Kcal/1895,7 kJ, složení: sacharidy 49,2 g (44,55%), proteiny 18,5 g (16,74%), lipidy 18,8 g (38,7%), z toho

saturované 6,8 g, monoenové 6,0 g, polyenové 5,0 g/. Odběry ke stanovení glykémie, c-peptidu, imunoreaktivního inzulinu (IRI), lipidů (TAG a FFA) a GIH se prováděly v 0, 30, 60, 120 a 180té minutě po snídani.

- c) Hyperinzulínový (1 mU/kg/min) izoglykemický clamp (HIC) v trvání 3 hodin s nepřímou kalorimetrií. Metoda umožňuje přesnou kvantifikaci inzulinové rezistence a utilizace energetických substrátů.
- d) Protonová MR spektroskopie (MRS) jater ke kvantifikaci obsahu tuku v játrech. Měření probíhalo pomocí 3T MR scanneru (Magnetom – Trio Siemens). Změřená spektra byla získána ze třech různých částí jater. Z dat byl spočten celkový signál jaterní tukové tkáně (fat total signal area; FTSA).

3.1.3. Analytické metody

3.1.3.1. Složení mastných kyselin ve fosfolipidech séra

Po extrakci lipidů ze séra podle Folcha a rozdělení jednotlivých frakcí chromatografií na tenké vrstvě byla provedena analýza metylesterů jednotlivých mastných kyselin ve fosfolipidech séra metodou plynové chromatografie.

Ostatní metody byly popsány podrobně v předešlém v projektu 1.

3.1.4. Statistická analýza

Kalkulace počtu zařazených osob byla provedena na základě silové analýzy opakovaných měření pomocí statistického softwaru PASS 2005 (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT, USA). Analýza „intention-to-treat“, zahrnovala všechny účastníky studie. Pro statistickou analýzu jsme použili 2x2 crossover ANOVA test. Do modelu byl zahrnut interindividuální faktor „sequence“, faktor „subject“ a intraindividuálního faktory „period“ a „treatment“. Data byla vyjádřena jako průměry \pm 95% konfidenční interval spolehlivosti. Faktor „sequence“ nebyl statisticky významný pro žádnou proměnnou. Pro výpočet korelací byl použit Pearsonův korelační koeficient. V následujících subanalýzách jsme přidali do statistického modelu další faktory. Faktor „prepared meals“, který nám pomohl zjistit rozdíly mezi proměnnými u pacientů, kteří měli jídlo po dobu studie zajištěné a faktor „gender“, kterým jsme zjišťovali případné rozdíly mezi oběma pohlavími u změn gastrointestinálních peptidů.

3.2. Výsledky

3.2.1. Tělesná hmotnost a BMI

Tělesná hmotnost klesla při obou režimech ($p < 0,001$), více při B (-2,3; 95% CI -2,7 do -2,0 kg při A vs. -3,7; 95% CI -4,1 do -3,4 kg při B; $p < 0,001$). Podobně dopadlo i hodnocení pomocí body-mass-indexu (BMI), který se snížil při obou režimech ($p < 0,001$), více při B (-0,82; 95% CI -0,94 do -0,69 kg.m⁻² při A vs. -1,23; 95% CI -1,4 do -1,17 kg.m⁻² při B; $p < 0,001$).

3.2.2. Obsah tuku v játrech

Obdobné trendy k poklesu byly patrné i v obsahu tuku v játrech, který byl měřen protonovou MR spektroskopií pomocí 3T MR scanneru (Magnetom – Trio Siemens). FTSA se významně snížil v obou jídelních režimech ($p < 0,001$), více v B (-3,4; 95% CI, -3,8 až -3,1 % v A vs. -4,2; 95% CI, -4,5 až -3,8% v B; $p = 0,03$).

3.2.3. Kompenzace diabetu

Oba režimy vedly ke srovnatelnému zlepšení kompenzace diabetu, hodnocenému pomocí HbA_{1c}. HbA_{1c} klesl srovnatelně při obou testovaných režimech. Pokud byl hodnocen efekt na lačnou glykémii, měl režim dvou jídel denně významně příznivější vliv. Glykémie nalačno klesla při obou režimech ($p < 0,001$), více při B (-0,47; 95% CI -0,57 do -0,36 mmol/L při A vs. -0,78; 95% CI -0,89 do -0,68 mmol/L při B; $p = 0,004$). Snížení obsahu tuku v játrech pozitivně korelovalo se snížením lačné glykémie ($r = +0,56$; $p < 0,001$). Po adjustaci na změny v BMI zůstala tato asociace signifikantní ($r = +0,28$; $p = 0,05$).

3.2.4. Inzulínová rezistence

Inzulínová rezistence byla hodnocena dvěma metodami: jednak jako metabolická clearance glukózy v posledních 30 minutách hyperinzulínového izoglykemického clampu (MCR) a jednak pomocí matematického modelování z hodnot glykémie a c-peptidu při meal testu. Takto vypočítaná inzulínová senzitivita (OGIS) udává clearance glukózy na jednotku změny inzulínu při meal testu. Podrobněji viz Příloha 3.

MCR se signifikantně srovnatelně zvýšila ($p < 0,001$) u obou testovaných režimů. OGIS se také zvýšila při obou režimech ($p < 0,01$), ale významně více při B (8,2; 95% CI 3,4 do 13,1 ml.min⁻¹m⁻² při A vs. 21,0; 95% CI: 16,1 do 26,0 ml.min⁻¹m⁻² při B; $p < 0,01$). Změny v

glukózové senzitivitě (MCR) a OGIS korelovaly negativně se změnami obsahu tuku v játrech ($r=-0,28$; $p=0,02$ a $r=-0,47$; $p<0,001$). Po adjustaci na změny v BMI nebyly tyto korelace již signifikantní.

3.2.5. Sekrece inzulinu

Sekrece inzulinu byla hodnocena z hodnot c-peptidu a IRI při meal testu. Z naměřených hodnot byla stanovena rychlost sekrece inzulinu a funkce β -buněk pomocí dekonvoluce křivky c-peptidu a matematickým modelováním, které popisuje rychlost sekrece inzulinu jako funkci absolutních koncentrací glukózy (sekreční tonus inzulinu a glukózová senzitivita), rychlosti změn koncentrace glukózy a potenciačního faktoru. Podrobněji viz . Příloha 1.

Absolutní hodnoty c-peptidu klesly při obou režimech ($p<0,001$), více při B ($-0,05$; 95% CI $-0,09$ do $-0,01$ nmol/L při A vs. $-0,14$; 95% CI $-0,18$ do $-0,1$ nmol/L při B; $p=0,05$). Sekrece inzulinu při referenční koncentraci glukózy a glukózová senzitivita se zvýšily ($p<0,05$) srovnatelně při obou režimech.

3.2.6. Klidový energetický výdej

Respirační kvocient se zvýšil při obou režimech ($p<0,01$) s trendem k většímu zvýšení při A ($0,06$; 95% CI $0,04$ do $0,07$ při A vs. $0,04$; 95% CI: $0,02$ do $0,05$ při B; $p=0,2$). REE klesl při obou režimech ($p<0,001$) s trendem k většímu poklesu při A ($-108,3$; 95% CI $-125,3$ do $-91,5$ kcal/day při A vs. $-90,8$; 95% CI $-107,5$ do $-74,3$ kcal/day při B; $p=0,3$) (**Obrázek 16**).

3.2.7. Markery oxidačního stresu

Redukovaný glutathion se zvýšil při obou režimech ($p<0,01$) srovnatelně ($49,0$ umol/l; 95% CI: $14,0$ do $83,0$ umol/l při A vs. $99,0$ umol/l; 95% CI: $65,0$ do $134,0$ umol/l při B; $p=0,1$). Oxidovaný glutathion se významně snížil jen při režimu B ($p<0,001$: $-4,0$ umol/l; 95% CI: $-8,7$ do $0,3$ umol/l při A vs. $-19,0$ umol/l; 95% CI: $-23,0$ do $-14,5$ umol/l; $p=0,002$). Poměr redukovaného a oxidovaného glutathionu se snížil při režimu A ($p<0,01$), při režimu B nebyla změna významná ($-10,7$; 95% CI $-14,9$ do $-6,6$ in A vs. $-1,6$; 95% CI $-5,8$ do $2,6$ při B; $p<0,05$). Superoxid dismutáza se zvýšila při obou režimech ($p<0,001$), více při režimu A ($0,75$ U/ml; 95% CI: $0,6$ do $0,9$ U/ml při A vs. $0,2$; 95% CI: $0,1$ do $0,4$ U/ml při B; $p<0,001$). Konjugované dieny se snížily při obou režimech ($p<0,05$) ($-2,7$ umol/l; 95% CI: $-4,8$ do $-0,6$ umol/l při A vs. $-5,4$ umol/l; 95% CI: $-7,6$ do $-3,3$ umol/l při B; $p=0,2$). TBARS se snížily při obou režimech ($p<0,001$), více při režimu A ($-0,44$ umol/l; 95% CI: $-0,49$ do $-0,39$ umol/l při A vs. $-0,28$ umol/l; 95% CI: $-0,32$ do $-0,23$ umol/l při B; $p<0,01$). Kyselina askorbová se

zvýšila při obou režimech srobnatelně ($p < 0,01$) (8,0 umol/l; 95% CI: 5,7 do 10,3 umol/l při A vs. 4,1 umol/l; 95% CI: 1,8 do 6,4 umol/l při B; $p = 0,1$). Mikroalbuminurie stoupla při režimu A vs. při režimu B se nezměnila (2,5 ug/ml; 95% CI: 0,9 do 4,1 ug/ml při A vs. -1,1 ug/ml; 95% CI: -2,7 do 0,5 ug/mL při B; $p < 0,05$).

3.2.8. Ostatní parametry

Sérové lipidy: triglyceridy a LDL-cholesterol klesly srovnatelně při obou režimech, naproti tomu nedošlo k významným změnám celkového cholesterolu či HDL cholesterolu. Krevní tlak se taktéž významně nezměnil.

Obrázek 16: Změny fyzikálních a laboratorních ukazatelů po dvou dietních režimech, se šesti (A6) a dvěma (B2) jídly denně

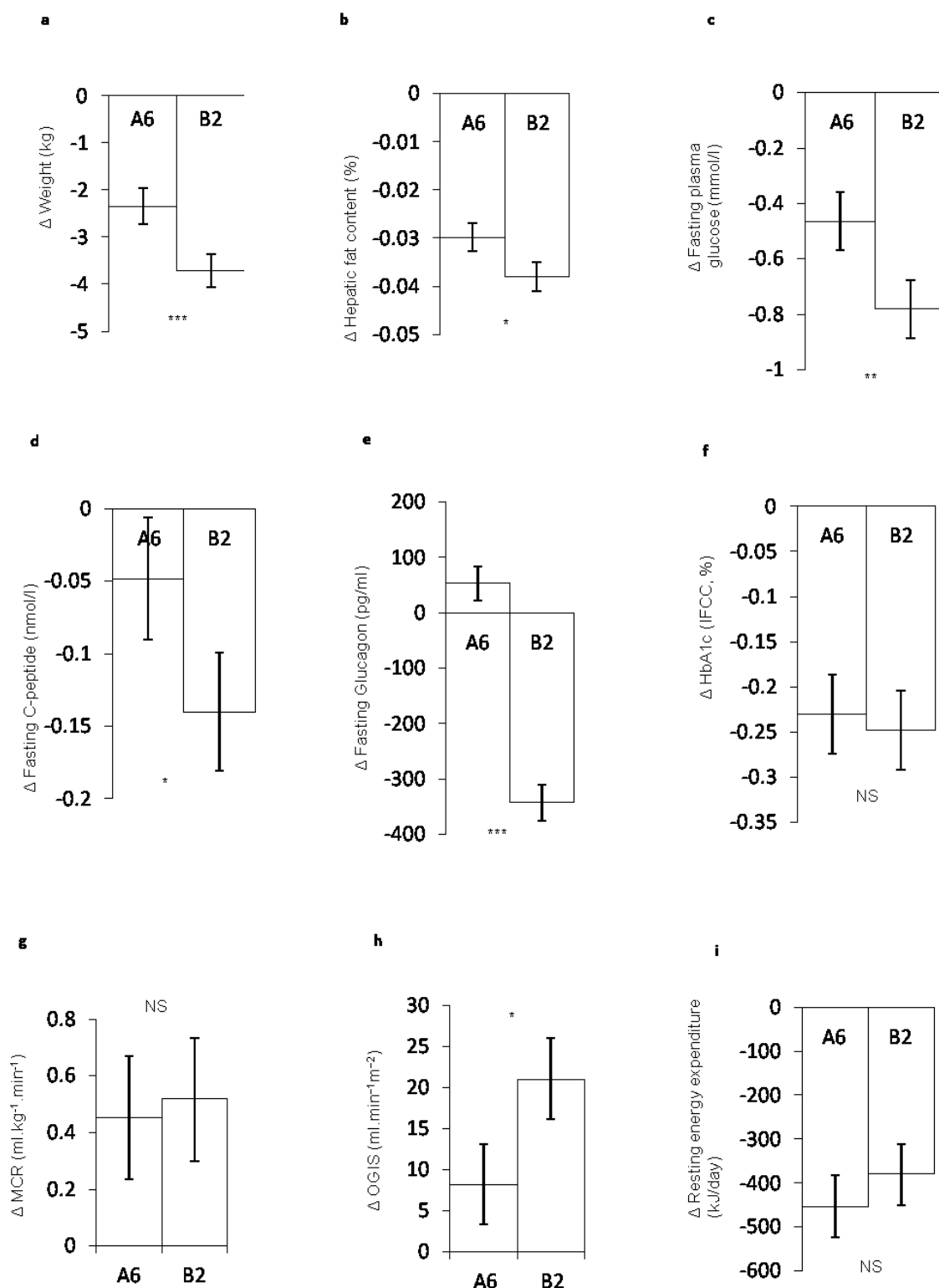


Figure 16: Changes in anthropometric and laboratory parameters. Data are shown as changes from baseline in response to the regimen of six (A6) and two meals a day (B2). Data are means \pm 95% Confidence intervals. Significance of the factor treatment (assessed by 2x2 crossover ANOVA) is indicated by * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$, *** for $p < 0.001$ and ns for non-significant. a: Δ Weight, $n=54$, b: Δ Hepatic fat content, $n=48$, c: Δ Fasting plasma glucose, $n=54$, d: Δ Fasting plasma C-peptide, $n=54$, e: Δ Fasting plasma glucagon, $n=54$, f: Δ HbA1c, $n=54$, g: Δ Metabolic clearance rate of glucose, $n=49$, h: Δ Insulin sensitivity (OGIS), $n=51$, i: Δ Resting energy expenditure, $n=52$

3.2.9. Chutňové hormony

Koncentrace leptinu nalačno klesla srovnatelně ři obou režimech ($p=0,37$; -1308pg/ml ; 95% CI: $-1941, -693\text{pg/ml}$ při A6 vs. -1862pg/ml ; 95% CI: $-2513, -1231\text{pg/ml}$ při B2). U žen byla koncentrace leptinu na lačno významně vyšší než u mužů ($p<0,001$). Po obou dietách se hladina leptinu u žen snížila, ale mužů nebyla změna koncentrace leptinu významná ($p=0,02$; -3000pg/ml ; 95% CI: -4423 do -1672pg/ml u žen vs. -255pg/ml ; 95% CI: -1174 do 626pg/ml u mužů). Koncentrace ghrelinu na lačno se po obou intervencích významně změnila ($p<0,01$), při režimu A6 ($p<0,001$) se snížila, při režimu B2 došlo ke zvýšení ($p=0,023$; $-5,42\text{pg/ml}$; 95% CI: $-10,1$ do $-0,1\text{pg/ml}$ při A6 vs. $4,5\text{pg/ml}$; 95% CI: $0,37$ do $8,5\text{pg/ml}$ při B2) (**Obrázek 17**). Pokles hmotnosti koreloval nepřímo úměrně se změnou koncentrace ghrelinu nalačno ($r = -0,4, p<0,043$). Pokles ghrelinu po jídle koreloval pozitivně s hladinou ghrelinu nalačno ($r=0.9, p<0.001$). Mezi poklesem pocitů hladu a změnou hladiny ghrelinu nalačno jsme v naší studii nezjistili žádný vztah ($p=0,7$). U žen a mužů byly změny koncentrace ghrelinu srovnatelné ($p=0,85$; $-1,36\text{pg/ml}$; 95% CI: $-13,29$ do $9,8\text{pg/ml}$ u žen vs. $0,59\text{pg/ml}$; 95% CI: $-8,5$ do $9,2\text{pg/ml}$ u mužů). Odpovědi obou hormonů po jídle nebyly vlivem obou dietních režimů změněny. Tvar křivky postprandiální odpovědi („interaction diet x time“) byl srovnatelný (**Obrázek 18**). Hladina ghrelinu na lačno a po 180 minutách po standardním jídle při mealtestu byla vyšší po režimu se dvěma jídly denně.

3.2.10. Gastrointestinální hormony

Koncentrace GIP nalačno klesla po dietní intervenci bez významného rozdílu mezi oběma dietními režimy ($p=0,83$; $-3,36\text{pg/ml}$; 95% CI: $-4,8$ do $-1,96\text{pg/ml}$ při A6 vs. $-3,1$; 95% CI: $-4,44$ do $-1,73\text{pg/ml}$ při B2;) stejně tak nebyl rozdíl ani mezi ženami a muži ($p=0,39$). Postprandiální odpověď GIP se vlivem obou diet změnila ($p<0,0001$) (**Obrázek 18**). Před dietní intervencí byl vzestup GIP při mealtestu významně vyšší v prvních 30- ti minutách po jídle než po obou dietách, kdy jsme sledovali nižší křivky, které byly srovnatelné po obou dietních režimech. Koncentrace PP se zvýšila po B2 a zůstala beze změny po A6 ($p=0,17$; $4,64\text{pg/ml}$; 95% CI: $-6,9$ do $16,6\text{pg/ml}$ při A6 vs. $21,0\text{pg/ml}$; 95% CI: $8,87$ do $33,6\text{pg/ml}$ při B2), rozdíl mezi oběma dietními režimy nebyl ani mezi oběma pohlavími ($p=0,76$). Postprandiální odpovědi PP po jídle byly rovněž srovnatelné při všech třech mealtestech (interaction diet x time: $p=0,34$). Koncentrace GLP-1 nalačno ($p=0,65$; $-1,571\text{pg/ml}$; 95% CI: $-7,02$ do $3,88\text{pg/ml}$ při A6 vs. $-3,91\text{pg/ml}$; 95% CI: $-9,1$ do $1,28\text{pg/ml}$ při B2), ani jeho postprandiální odpověď (interaction diet x time: $p=0,998$) se významně nezměnila, bez rozdílu v pohlaví ($p=0,39$).

Dietní intervence neměla vliv ani na PYY. Bez významné změny zůstala koncentrace nalačno ($p=0,21$; 2,14; 95% CI: -1,03 do 5,26 pg/ml při A6 vs. -1,71; 95% CI: -4,84 do 1,37 pg/ml při B2) i během meal testu (**Obrázek 18**). Mezi ženami a muži nebyl v sérové koncentraci tohoto peptidu významný rozdíl ($p=0.79$). Koncentrace amylinu nalačno poklesla při dietním režimu se dvěma jídly denně a zůstala beze změny při dietním režimu se šesti jídly za den ($p=0,1$; 1,77 pg/ml; 95% CI: -1,18 do 4,76pg/ml při A6 vs. -3,04 pg/ml; 95% CI: -5.91 do -0,12 pg/ml při B2). Postprandiální odpověď amylinu byla bez významného rozdílu (interaction diet x time: $p=0.97$). Ani rozdíl mezi ženami a muži nebyl významný ($p=0.9$).

Obrázek 17: Změny fyzikálních a laboratorních ukazatelů po dvou dietních režimech, se šesti (A6) a dvěma (B2) jídly denně

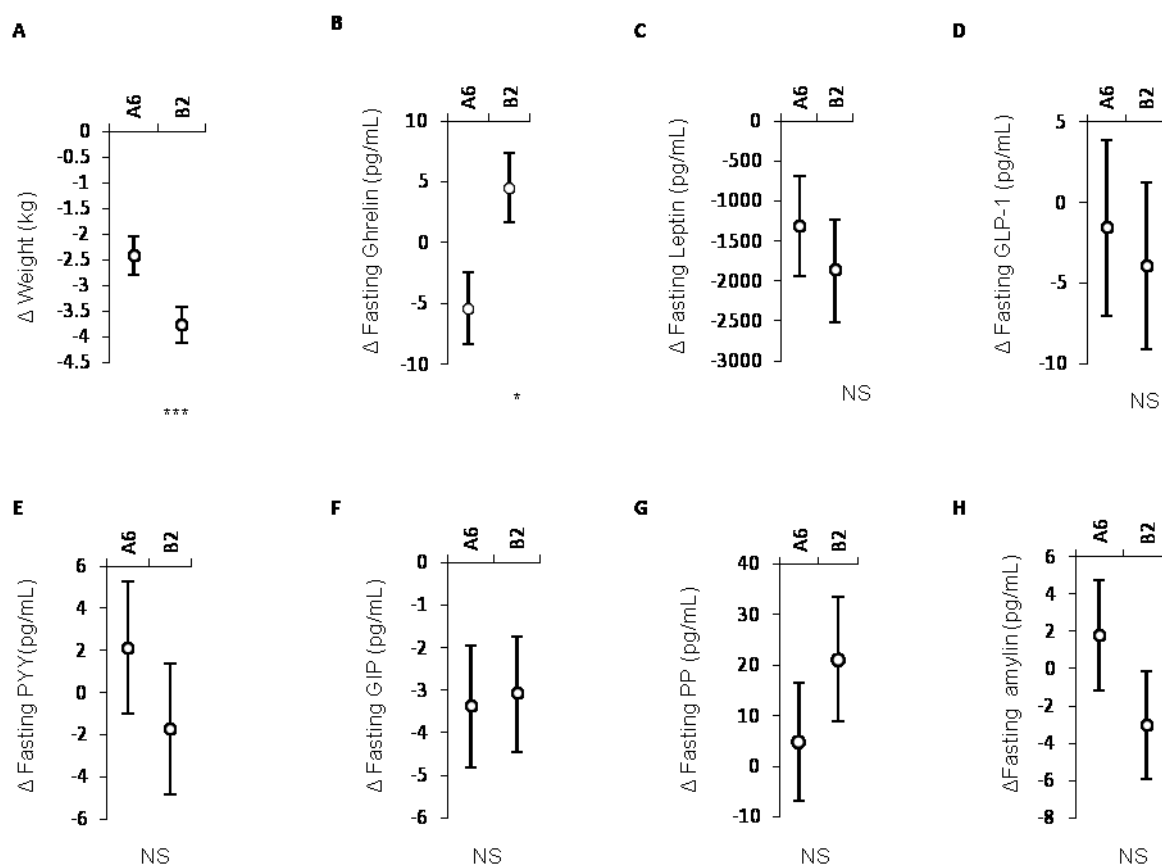


Figure 17: Changes in anthropometric and laboratory parameters. Data are shown as changes from baseline in response to the regimen of six (A6) and two meals a day (B2). Data are means with 95% CI. Significance of the factor treatment (assessed by 2x2 crossover ANOVA) is indicated by * for $p<0.05$, ** for $p<0.01$, *** for $p<0.001$ and NS for non-significant. a: Δ Weight, n=54, b: Δ Fasting ghrelin, n=54, c: Δ Fasting leptin, n=54, d: Δ Fasting GLP-1, n=54, e: Δ Fasting PYY, n=54, f: Δ Fasting GIP, n=54, g: Δ Fasting PP, n=54, h: Δ Fasting amylin, n=54.

Obrázek 18: Postprandiální změny v plasmatické koncentraci gastrointestinálních hormonů před dietní intervencí a po dietních režimech se dvěma (B2) a šesti (A6) jídly denně

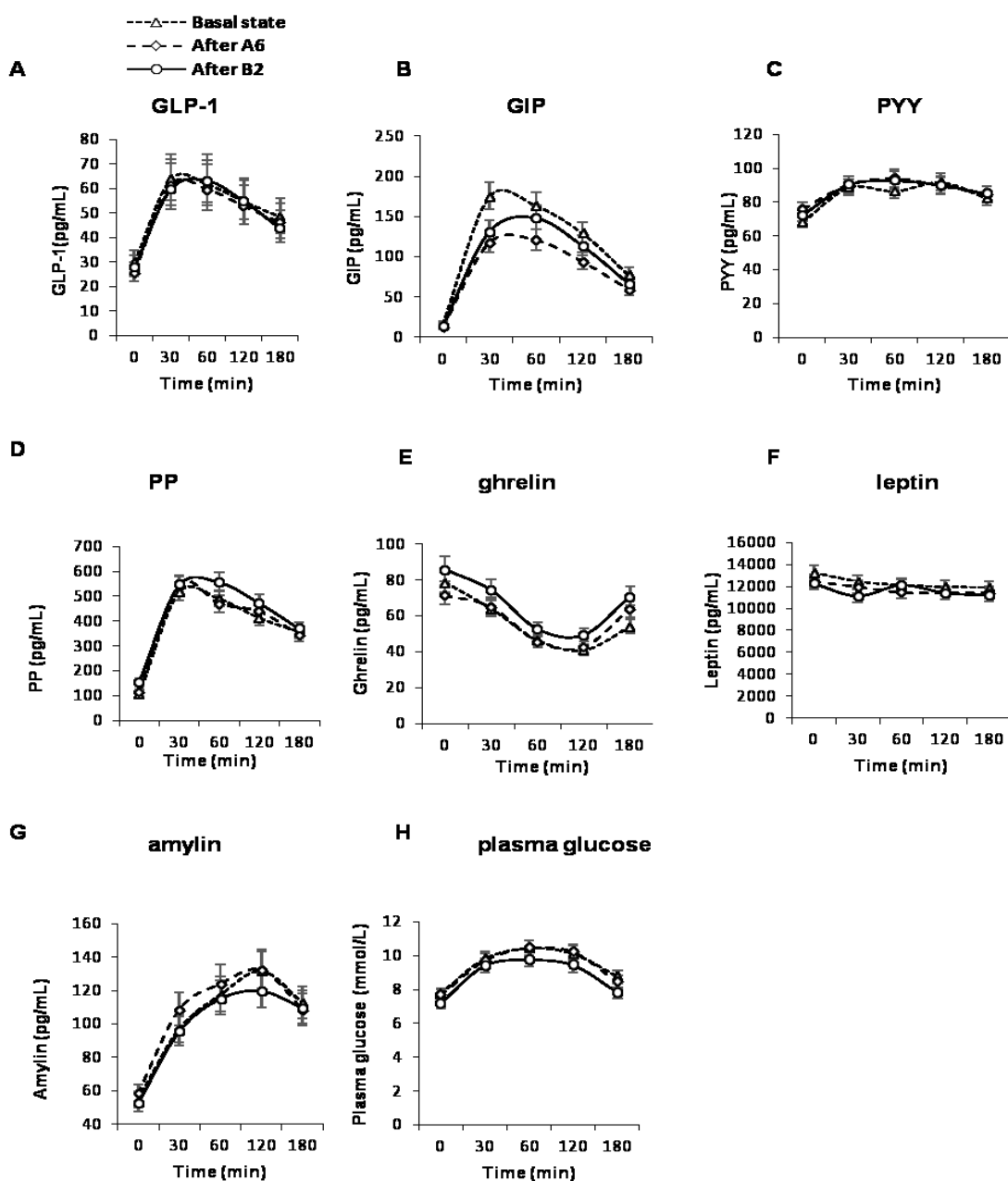


Figure 18: Postprandial changes in plasma concentrations of gastrointestinal and appetite hormones after standard meal ingestion. At basal state (triangle, dotted line), after the diet regimen with six meals a day, A6 (rhombus, dashed line) and after the diet regimen with 2 meals a day, B2 (circle, dashed line). Data are expressed as mean with 95% CI.
A: GLP-1: Factors diet: $F=0.4$, $p=0.6828$; time: $F=28.5$, $p<0.0001$; subject: $F=37.5$, $p<0.0001$; interaction diet \times time: $F=0.1$, $p=0.9984$.
B: GIP: diet: $F=17.3$, $p<0.0001$; time: $F=291.7$, $p<0.0001$; subject: $F=17$, $p<0.0001$; interaction diet \times time: $F=0.7$, $p=0.7093$.
C: PYY: diet: $F=1.7$, $p=0.1897$; time: $F=20.7$, $p<0.0001$; subject: $F=29.1$, $p<0.0001$; diet \times time: $F=0.6$, $p=0.8173$.
D: PP: diet: $F=8.7$, $p=0.0002$; time: $F=298$, $p<0.0001$; subject: $F=101.4$, $p<0.0001$; interaction diet \times time: $F=1.1$, $p=0.3409$.
E: ghrelin: diet: $F=13.6$, $p<0.0001$; time: $F=61.6$, $p<0.0001$; subject: $F=47.5$, $p<0.0001$; interaction diet \times time: $F=0.9$, $p=0.503$.
F: leptin: diet: $F=3.7$, $p=0.0263$; time: $F=3.6$, $p=0.0074$; subject: $F=274$, $p<0.0001$; interaction diet \times time: $F=0.5$, $p=0.8241$.
G: amylin: diet: $F=1.9$, $p=0.1551$; time: $F=83$, $p<0.0001$; subject: $F=27$, $p<0.0001$; interaction diet \times time: $F=0.3$, $p=0.9669$.
H: plasma glucose: diet: $F=8.6$, $p=0.0002$; time: $F=53.5$, $p<0.0001$; subject: $F=59.5$, $p<0.0001$; diet \times time: $F=0.3$, $p=0.981$.

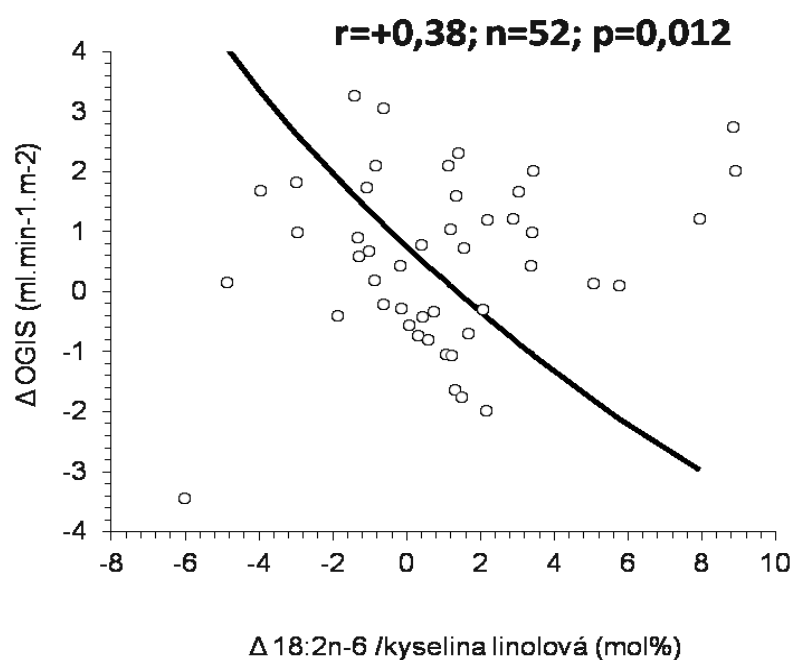
3.2.11. Kvalita života, Beckovo skóre deprese, pocity hladu, disinhibice a pocity dietní restrikce

Kvalita života se zvýšila ($p<0,01$) srovnatelně při obou režimech. Beckovo skóre deprese se snížilo ($p<0,05$) při obou režimech, ale více při dvou jídlech denně ($p=0,04$). Pocity dietní restrikce se zvýšily ($p<0,01$) srovnatelně při obou režimech. Disinhibice se snížila ($p<0,01$) srovnatelně při obou režimech. Pocity hladu se významně snížily ($p<0,001$) pouze při dvou jídlech denně, zatímco během režimu se 6 jídlů denně se nezměnily (rozdíl mezi režimy: $p<0,001$).

3.2.12. Složení mastných kyselin ve fosfolipidech séra

Zjistili jsme, že při obou jídelních režimech nasycené mastné kyseliny (zejména kyselina miristová a palmitová) v uvedené frakci klesají ($p<0,001$) a n-6 polynenasycené mastné kyseliny, včetně kyseliny linolové, naopak stoupají ($p<0,001$). Tyto pozitivní změny jsou významně větší při režimu se dvěma jídly ($p<0,001$). Obsah monoenoových mastných kyselin klesá ($p<0,05$) a obsah n3 polynenasycených mastných kyselin významně stoupá ($p<0,001$) srovnatelně při obou jídelních režimech. Zvýšení obsahu kyseliny linolenové bylo pozitivně asociováno se zvýšením účinku inzulínu, který jsme testovali pomocí OGIS (**Obrázek 19**). Tato korelace přetrvávala i po adjustaci na změny v BMI ($r=+0,38$; $p=0,012$).

Obrázek 19: Korelace mezi změnou poměru kyseliny linolové (18:2n-6) v sérových fosfolipidech a změnou inzulínové senzitivity (stanovené pomocí OGIS při mealtestu)



3.3. Diskuse

Prokázali jsme, že hypokalorická dieta rozdělená do dvou jídel denně (B2) vede u nemocných s diabetem k většímu snížení tělesné hmotnosti, poklesu obsahu tuku v játrech, lačné glykémie, c-peptidu, glukagonu a inzulínové rezistence hodnocené pomocí OGIS (parametr matematického modelování při mealtestu) než dieta se stejnou kalorickou restrikcí rozdělená do šesti menších jídel (A6). Příznivý vliv hypokalorické diety s menší frekvencí jídel je v souladu s naší hypotézou a potvrzují ho i observační studie a studie na zvířatech. V posledních letech se objevila řada experimentálních dokladů o pozitivních efektech protrahovaného hladovění a zprávy o výhodách, které by mohla mít konzumace jídla s nižší frekvencí pro léčbu obezity a případně dalších civilizačních chorob jako je DM2 [Hatori et al., 2012, Howarth et al., 2007] [Duval et al., 2008] [Garaulet et al., 2013] [Purslow et al., 2008]. Pokusy na zvířatech podporují antidiabetický vliv kalorické restrikce a diet s přechodným půstem. Režimy s přechodným půstem, jako je „every-other-day fasting“ (EODF), každý druhý den půst, nejčastěji používaný protokol ve studiích se zvířaty, mohou prodloužit délku života u krys i myši [Wang et al., 1997]. Kalorická restrikce i EODF snižují u hlodavců plazmatické hladiny glukózy a inzulínu a zlepšují glukózovou toleranci [Anson et al., 2003], [Anson et al., 2003] [Pedersen et al., 1999], hlavně zvýšením senzitivity k inzulínu [Anson et al., 2005]. Běžně doporučená schémata pro zdravou výživu počítají s rozdělením kalorického příjmu do minimálně pěti porcí denně. Předpokládá se, že pokud se bude jíst častěji, povede to ke snížení hladu a tím ke snížení energetického příjmu a tělesné hmotnosti. Navzdory tomu, co je často deklarováno, jíst častěji během dne nevede ke snížení kalorického příjmu a k redukci váhy, což potvrdila i nedávno provedená rozsáhlá metaanalýza [Raynor et al., 2015]. Naopak existují doklady pro to, že častější příjem menších porcí jídla během dne zvyšuje riziko rozvoje obezity [van der Heijden et al., 2007] a DM2 [Mekary et al., 2012] [Mekary et al., 2013], což je vysvětlováno zvýšením energetického příjmu [Larson and Story, 2013]. Předešlé studie, které sledovaly vliv frekvence jídel na DM2, nabyly dostatečně velké a trvaly krátkou dobu. Studie trvající osm měsíců, srovnávala vliv tří nebo devíti jídel denně (každá perioda trvala čtyři měsíce) u 13- ti pacientů s DM2. Ani tato studie nepotvrdila, že by častější příjem jídel byl pro pacienty s DM2 prospěšný [Arnold et al., 1997]. Recentní studie u pacientů s DM2 potvrzují, že pro kontrolu glykémie během dne, je výhodnější jíst méně často větší jídla s vyšším obsahem vlákniny než více menších jídel [Fernemark et al., 2013]. V naší práci jsme jako první popsali vliv frekvence jídel na inzulínovou rezistenci a obsah tuku

v játrech (HFC) u pacientů s DM2. Snížení obsahu tuku v játrech bylo provázeno snížením glykémie nalačno nezávisle na změně hmotnosti. Senzitivita k inzulinu vyjádřená pomocí metabolické clearance glukózy (MCR) se zvýšila při obou dietních režimech srovnatelně, ale při režimu B2 jsme sledovali trend k většímu zvýšení. Rozdíl mezi oběma režimy nebyl významný, pravděpodobně pro nedostatečný počet účastníků. Clearance glukózy na jednotku změny inzulinu při meal testu (OGIS) se zvýšila při obou režimech, významně více při režimu B2. Zvýšená senzitivita k inzulinu vedla ke snížení glykémie nalačno a obsahu tuku v játrech (i když HbA_{1c} klesl při obou režimech srovnatelně) nebo naopak snížení HFC mohlo vést ke zvýšení senzitivity k inzulinu. HFC je spojován s rozvojem inzulinové rezistence (nezávisle na změně BMI) [Seppala-Lindroos et al., 2002], metabolickým syndromem, DM2 a subklinickou aterosklerózou [Juarez-Rojas et al., 2013]. Větší pokles obsahu tuku v játrech po režimu B2 je v tomto kontextu důležitým výstupem naší studie. Jako první jsme rovněž prokázali větší pokles glukagonu nalačno s režimem B2. Zvýšené sérové koncentrace glukagonu se podílejí u pacientů s diabetem na poruše produkce glukózy v játrech [D'Alessio, 2011]. V současné době neexistuje kauzální léčba, která by snižovala zvýšenou hladinu glukagonu. Inkretinová mimetika mohou hladinu glukagonu snížit, v čem částečně spočívá i jejich vliv na snížení hladiny glukózy [Edwards et al., 2012].

Při obou dietních režimech jsme sledovali redukci váhy, která byla významně vyšší při režimu s menším počtem porcí během dne. Jedním z mechanismů, který by to mohl vysvětlovat, je trend k nižšímu poklesu klidového energetického výdeje (REE), který jsme při režimu B2 sledovali, i když rozdíl mezi oběma režimy nedosáhl statistické významnosti. Trend k nižšímu poklesu energetického výdeje při režimu dvou jídel denně je v souladu s hypotézou, že změny v bazálním metabolismu by mohly být jedním z potenciálních mechanismů, které se uplatňují na příznivém efektu snížení počtu porcí denně u diabetiků. Dalším možným vysvětlením by mohla být termogeneze indukovaná potravinami (DIT). Existují doklady pro to, že větší jídla vyvolají vyšší produkci tepla, které musí organismus vynaložit, aby zpracoval přijaté potraviny, než menší porce o stejném energetickém obsahu [Tai et al., 1991]. Důležitou roli může hrát také délka pauzy a tedy lačnění během jednotlivými jídly. Je možné, že při režimu B2 byly některé sledované pozitivní účinky způsobené delší dobou lačnění. V jedné experimentální studii bylo prokázáno, že správné načasování jídel vede ke zlepšení senzitivity k inzulinu a snížení tělesné hmotnosti nezávisle na složení jídla [Sherman et al., 2012]. Důležitým faktorem se zdá být distribuce jídla během dne. Příjem potravy v pozdějších odpoledních hodinách má negativní vliv na snížení hmotnosti. Tento rozdíl ve výsledném

snížení hmotnosti není způsoben rozdílem v energetickém příjmu, obsahu makronutrientů ani energetickém výdeji [Garaulet et al., 2013]. Ukazuje se, že načasování příjmu potravy může ovlivnit cirkadiánní systém [Bienertova-Vasku et al., 2010, Garaulet and Madrid, 2010]. Genetická rozdílnost v genech ovlivňujících cirkadiánní systém „clock genes“ může hrát roli i při časování příjmu potravy. Může se pravděpodobně podílet na řízení cirkadiánní kontroly hladu a chuti k jídlu [Ma et al., 2003, Scheer et al., 2013]. Přesné mechanismy nejsou známy, ale svůj podíl na časování příjmu potravy a regulaci tělesné hmotnosti mají chuťové a gastrointestinální hormony [Arble et al., 2009].

Vliv frekvence jídel na kompenzaci diabetu hodnocenou pomocí HbA1c a na sekreci inzulinu a sérové lipidy nebyl významný. Sekrece inzulinu při referenční koncentraci glukózy, HbA1c a lipidy se zvýšily srovnatelně při obou režimech. Snížení kalorického příjmu mělo vliv na snížení markerů oxidačního stresu srovnatelně při obou dietních režimech. Některé ukazatele pro zvýšený oxidační stres klesly při režimu B2, jiné při A6. Nedokážeme tedy zhodnotit, který režim byl v tomto ohledu výhodnější. Pro lepší představu by bylo vhodné provést monitoraci změn oxidačního stresu během 24 hodin. V naší studii jsme sledovali pouze změny nalačno.

Cílem sekundární analýzy bylo zjistit vliv obou hypokalorických režimů (A6 a B2) na koncentraci gastrointestinálních a chuťových hormonů nalačno a jejich postprandiální odpověď po standardním jídle. Prokázali jsme, že frekvence jídel ovlivňuje koncentraci ghrelinu nalačno i jeho postprandiální pokles. Dieta s nižší frekvencí jídel vedla k většímu zvýšení ghrelinu nalačno. Tato změna negativně korelovala se sledovanou změnou hmotnosti. Zvýšení ghrelinu v ranních hodinách by mohlo být pro pacienty s DM2 výhodné. Podle observačních studií mají totiž obézní jedinci a pacienti s DM2 po probuzení prokazatelně nižší chuť k jídlu a mají tak sklon k vynechávání snídaně. Pravidelné vynechávání snídaně je spojeno se zvýšeným rizikem obezity a špatnou kontrolou glykémie při stejném denním příjmu energie [Jakubowicz et al., 2015, Mekary et al., 2012, Reutrakul et al., 2014]. Zvýšení ghrelinu nalačno by mohlo vést ke zvýšení chuti k jídlu v ranních hodinách, kdy je dle studií nejvýhodnější větší energetický příjem. Důležitou roli hraje i samotná délka lačnění během jednotlivými jídly. Při režimu B2 byla vyšší hladina ghrelinu nalačno pravděpodobně důsledkem delší doby lačnění. Bylo prokázáno, že vzestup hladiny ghrelinu před jídlem souvisí právě s délkou intervalu mezi jídly [Blom et al., 2009]. Sledovaná negativní korelace ghrelinu nalačno se změnou hmotnosti není překvapující. O ghrelinu je známo, že se jeho sérová koncentrace při redukční dietě zvyšuje [Cummings et al., 2002]. Jeho zvýšení má

stimulovat chuť k jídlu a zvýšit příjem energie, tak aby došlo k opětovnému utvoření tukových zásob. Existují ale i studie, které kompenzatorní zvýšení hladiny ghrelinu po redukci váhy nepotvrzují [de Luis et al., 2008]. Podle některých studií zvýšení hladiny ghrelinu provází i zvýšení hladu [Cummings et al., 2004, DelParigi et al., 2002], ale jiné studie tuto souvislost vyvracejí [Schindler et al., 2004]. V naší studii změna ghrelinu nalačno se změnou pocitu hladu nijak nespojují. V režimu se dvěma jídly za den jsme sledovali snížení celkového pocitu hladu. I jiné randomizované studie, které hodnotily chuť k jídlu a pocity sytosti, potvrdily, že nižší frekvence jídla vede ke snížení hladu a k lepší kontrole chuti k jídlu během celého dne [Munsters and Saris, 2012] [Wagenknecht et al., 2007]. Nabízí se vysvětlení, že větší jídlo vyvolá větší pokles ghrelinu a více zasytí [Munsters and Saris, 2012]. Při redukční dietě je to tedy efektivnější než jíst menší porce jídla a nedosáhnout tak pocitu sytosti. U zdravých jedinců se během lačnění ghrelin zvyšuje a po jídle fyziologicky prudce klesá [Wren et al., 2000]. U obézních jedinců a pacientů s DM2 to tak úplně neplatí. Během lačnění u nich hladina ghrelinu tolik nevystoupá a ani po jídle není pokles ghrelinu tak výrazný jako u zdravých jedinců [English et al., 2002, Malinska et al., 2014]. Hypokalorická dieta spojená s redukcí váhy vede nejen ke zvýšení hladiny ghrelinu nalačno [Cummings et al., 2002, Purnell et al., 2007], ale je doloženo, že zlepšuje i jeho postprandiální odpověď [Moran et al., 2005]. Doba lačnění mezi jídly se zdá být v tomto ohledu dokonce důležitější, než samotné složení jídla. Z našich výsledků je zřejmé, že hladina ghrelinu nalačno byla ve 180 - té minutě po jídle významně vyšší po režimu B2. Potvrdili jsme souvislost mezi lačnou hladinou ghrelinu a jeho poklesem po jídle. Čím byla hladina ghrelinu nalačno vyšší, tím byl větší i jeho pokles. Dále jsme zjistili, že existuje souvislost mezi poklesem hladiny glukózy a opětovným vzestupem hladiny ghrelinu. Vzestup hladiny ghrelinu nejspíš souvisí s normalizací glykémie po jídle. Opoždění normalizace hladiny glykémie u diabetiků se tedy může spolupodílet na poruše vzestupu hladiny ghrelinu po jídle. Podobný efekt byl popsán i pro sérové koncentrace triglyceridů, které mají na opětovný vzestup ghrelinu podobný vliv jako hladina glukózy [Blom et al., 2009].

Další z chuťových hormonů, který naše práce hodnotila, byl leptin. Jedná se o adipokin produkovaný buňkami bílé tukové tkáně, který u zdravých jedinců snižuje chuť k jídlu. Při redukci váhy se jeho sérová koncentrace snižuje. Obézní jedinci a pacienti s DM2 mají hladiny leptinu zvýšené a je u nich doložena rezistence k jeho účinkům [Enriori et al., 2007]. Byla prokázána souvislost mezi rezistencí k inzulinu a leptinu [Wauters et al., 2003]. V naší studii se sérová koncentrace leptinu nalačno vlivem obou dietních režimů snížila srovnatelně.

Když jsme srovnávali muže a ženy, zjistili jsme, že se u žen před začátkem studie vyskytovaly významně vyšší sérové koncentrace leptinu než u mužů. Existují doklady pro to, že ženy se srovnatelným BMI a množstvím tělesného tuku, mají koncentrace leptinu významně vyšší než muži [Hellstrom et al., 2000, Hickey et al., 1996]. Hypokalorická dieta měla navíc na koncentraci leptinu u obou pohlaví rozdílný efekt. Zatímco u žen se sérové koncentrace leptinu snížily, u mužů zůstaly beze změny. Pokles hmotnosti byl u obou pohlaví srovnatelný. I ve studii, která trvala 6 měsíců, byl pokles leptinu větší u žen, ikdyž pokles tělesného tuku vlivem redukční diety byl u obou pohlaví srovnatelný [Nicklas et al., 1997]. Dle experimentálních studií zvyšuje leptin klidový energetický výdej. Při redukci váhy slouží jeho větší pokles u žen pravděpodobně jako ochrana poklesu tělesné hmotnosti a má z hlediska evoluce význam [Mauvais-Jarvis, 2015]. Postprandiální odpověď leptinu se po jídle příliš nemění [Scharf and Ahima, 2004] a ani v naší studii se po obou dietních režimech nijak nezměnila.

Koncentrace amylinu nalačno poklesla po dietním režimu s menší frekvencí jídel. Amylin je produkován společně s inzulinem při stimulaci glukózou [Kahn et al., 1990]. Dále může mít funkci na regulaci glykémie i celkového energetického metabolismu [Lutz, 2006]. Zdá se, že může snižovat i motilitu gastrointestinálního traktu a snižovat energetický příjem [Young, 2005]. U obézních jedinců aplikace analogu amylinu (pramlintidu) vyvolá snížení chuti k jídlu vedoucí ke snížení příjmu potravy a poklesu tělesné hmotnosti [Aronne et al., 2007]. Jako výhodná se ukazuje hlavně kombinace amylinu s jinými hormony jako je leptin. Postprandiální odpověď amylinu v naší studii byla srovnatelná ve všech třech mealtestech. Jeho postprandiální změny významně korelovaly se změnami všech GIH hormonů a silnou korelaci jsme sledovaly hlavně se změnami koncentrace leptinu, což už bylo dříve popsáno [Roth et al., 2008]. Chuť k jídlu reguluje amylin společně s ostatními hormony, hlavně s peptidem YY a GLP-1. Kombinace hormonů snižujících chuť k jídlu má silnější účinek [Lutz, 2013].

Koncentrace GLP-1 a PYY nalačno ani jejich postprandiální odpověď se vlivem obou dietních režimů nezměnila. Vzhledem k naší hypotéze jsme očekávali, že se vlivem hypokalorické diety koncentrace nalačno u obou peptidů sníží a že jejich postprandiální odpověď bude významně větší. Navíc jsme očekávali větší rozdíly při dietním režimu se dvěma jídly denně i s ohledem na větší pokles hmotnosti. U obou hormonů se v předešlých studiích prokázalo, že hypokalorická dieta a snížení hmotnosti vedou k poklesu jejich koncentrace nalačno [de Luis et al., 2007, Chan et al., 2006, Reinehr et al., 2007] a zvýšení

postprandiálních koncentrací obou hormonů po mealtestu [Iepsen et al., 2016]. Ve studii sledující vliv frekvence jídel sledovali autoři zlepšení postprandiální odpovědi GLP-1 při nižší frekvenci jídel [Munsters and Saris, 2012]. I ze studií na pacientech po bariatrickém výkonu, kteří významně redukovali hmotnost, je zřejmé, že postprandiální odpověď obou peptidů se zlepšuje při poklesu tělesné hmotnosti [Gerner et al., 2014]. Na druhou stranu, jiné studie poukazují na to, že zlepšení postprandiální odpovědi GLP-1 není výsledek redukce hmotnosti, ale restričního chirurgického výkonu, který zvyšuje hladiny GLP-1 [DePaula et al., 2008]. Potvrdili jsme, že změny GLP-1 po jídle korelují se změnami inzulínu po celou dobu trvání mealtestu. To nás nijak nepřekvapilo, vzhledem k tomu, že u GLP-1 je dobře zdokumentovaný jeho inkretinový efekt. PYY je důležitým regulačním peptidem gastrointestinálního traktu [Kim et al., 2005]. Je produkován ve všech segmentech trávicí trubice a to hlavně v L-buňkách ilea společně s GLP-1. Jeho možný vliv na ovlivnění chuti k jídlu a příjmu potravy je cílem výzkumu [Kelly et al., 2009]. Ukazuje se, že na rozdíl od anorektického efektu leptinu, vůči kterému vzniká rezistence, anorektický efekt PYY přetrvává i u obézních osob a osob s DM2 [Batterham et al., 2007]. Po intravenózní aplikaci PYY se snížila ve studii chuť k jídlu a zastavil se příjem potravy [Batterham et al., 2003]. Má tedy funkci hormonu sytosti. Jeho hladina se může zvýšit i vlivem zvýšené fyzické aktivity [Chandarana et al., 2009]. U zdravých jedinců se při lačnění jeho koncentrace nalačno snižuje [Chan et al., 2006]. U obézních jedinců byly posány jak nižší [le Roux et al., 2006], tak i vyšší hladiny PYY nalačno [Stock et al., 2005]. Hypokalorická dieta v naší studii neměla na postprandiální odpověď PYY vliv. Předpokládali jsme, že se postprandiální odpověď po dietním režimu zvýší a to více po režimu s větším poklesem hmotnosti. Zjistili jsme, že postprandiální změny PYY korelují pozitivně se změnami inzulínu. Tato souvislost mezi postprandiální koncentrací inzulínu a PYY ještě nebyla popsána.

Koncentrace PP nalačno se zvýšila po režimu se dvěma jídly za den. Pokud srovnáme oba dietní režimy mezi sebou, nebyl rozdíl statisticky významný. Role tohoto peptidu z hlediska ovlivnění příjmu potravy není jasná. Při intravenózní aplikaci způsobil u zdravých štíhlých jedinců snížení chuti k jídlu [Batterham et al., 2003]. Ve studii s pacienty s DM2 prokázaly vyšší hladiny nalačno a sníženou postprandiální odpověď podobně jako u peptidu PYY [Belinova et al., 2014]. Neprokáali jsme, že by hypokalorická dieta měla nějaký vliv na jeho postprandiální koncentraci. Podle toho, co je nám známo, nejsou zatím studie, který by efekt hypokalorické diety na průběh postprandiální odpovědi PP sledovaly [Mishra et al., 2016].

Koncentrace GIP nalačno poklesla po obou dietních režimech srovnatelně. Existují důkazy pro to, že zvýšená hladina GIP zvyšuje ukládání tuku, proto je jeho snížení vlivem hypokalarické diety příznivým nálezem [McClean et al., 2007]. Po jídle se hladina GIP zvyšuje, a to hlavně po tučném jídle. Jako jeden s dobře známých inkretinových hormonů potencuje tento peptid postprandiálně sekreci inzulínu [Meier, 2009]. Zjistili jsme, že změna koncentrace GIP po jídle významně koreluje se změnou inzulínu a to až mezi 120-180 - tou minutou po příjmu potravy. Bylo už dříve opakovaně prokázáno, že β -buňky pankreatu mají u pacientů s DM2 opožděnou první fázi sekrece inzulínu. Tato porucha je nejspíše i důsledkem snížené citlivosti β -buněk k účinku GIP v časně postprandiální fázi [Skrha et al., 2010]. Při meal testu, který jsme provedli před oběma dietními intervencemi, jsme v prvních 30- ti minutách po jídle sledovali vyšší koncentraci GIP než po hypokalarické dietě. Postprandiální odpověď GIP byla po obou dietních intervencích srovnatelná, ikdyž jsme předpokládali, že budou hladiny nižší po režimu se dvěma jídly denně kvůli většímu poklesu hmotnosti při tomto režimu [Weiss et al., 2015]. Bylo totiž dříve prokázáno, že hypokalarická dieta vedoucí k redukci hmotnosti je spojena s nižší koncentrací GIP při zátěžovém testu glukózou [Kelly et al., 2009]. Dietní režimy, které jsou spojeny se snížením postprandiální koncentrace tohoto anabolického peptidu mohou být více účinné k udržení tělesné hmotnosti [Ishii et al., 2016].

Existují doklady pro to, že větší jídla vyvolají vyšší produkci tepla, které musí organismus vynaložit, aby zpracoval přijaté potraviny, než menší jídla o stejném energetickém obsahu [Kelly et al., 2009]. Bylo prokázáno, že tato termogeneze indukovaná příjmem potravy je vyšší pokud sníme jedno velké jídlo než stejný obsah energie rozdělený do šesti menších porcí [Tai et al., 1991]. V jiné studii nižší postprandiální koncentrace GIP vedla k vyšší jídlům indukované termogenezi, kdy změny koncentrace GIP po jídle významně negativně korelovaly s DIT [Ishii et al., 2016]. V naší studii jsme termogenezi indukovanou jídlům nehodnotili. Tento mechanismus by možná vysvětlil vyšší pokles tělesné hmotnosti při režimu B2.

Silnou stránkou naší studie byl cross-over design, který nám umožnil zjistit rozdíly mezi oběma dietními režimy. Vzhledem k tomu, že si pacienti připravovali jídla sami, nemůžeme s jistotou tvrdit, že při režimu B2 nebyl příjem energie za den nižší. I když podle vyhodnocených dietních záznamů o energetickém příjmu, které pacienti po každé dietní intervenci odevzávali, nebyl mezi oběma režimy významný rozdíl. Energetický příjem a fyzická aktivita, měřená pomocí krokoměrů byly srovnatelné při obou dietních režimech. Prokázali jsme, že frekvence jídel ovlivňuje koncentraci ghrelinu nalačno i jeho postprandiální pokles. Sledované rozdíly v koncentraci ghrelinu nalačno i postprandiálně by

mohly vysvětlit naše zjištěné snížení pocitu hladu během dne při dodržování diety s nižší frekvencí jídel. Výsledky ukazují, že rozložení jídel do dvou porcí denně je při redukční dietě výhodnější než jíst častěji menší porce jídla, jak je běžně doporučováno.

Problémem redukčních režimů v klinické praxi je jejich dlouhodobé nedodržování. Významným faktorem, který hraje roli je subjektivní hodnocení daného režimu pacientem, proto byl v rámci sekundárního hodnocení zkoumán vliv frekvence jídel na kvalitu života, Beckovo skóre deprese a jídelní chování. Kvalita života byla zjišťována pomocí 2 dotazníků: Weight-Loss Quality-of-Life (OWLQOL) a Weight-Related Symptoms (WRSN). Použili jsme Třífaktorový dotazník k monitorování změn v jídelním chování a Beckův dotazník ke kvantifikaci vyhledání depresivních symptomů. Všichni účastníci byli vyšetřeni v týdnech 0, 12 a 24.

Oba režimy hypokalorické diety měly pozitivní účinky na kvalitu života, Beckovo skóre deprese a jídelní chování. Pozitivní účinky na depresivní symptomy a pocity hladu byly větší během režimu s dvěma jídly denně. Podle Třífaktorového dotazníku k monitorování změn jídelního chování se pocity dietní restrikce zvýšily srovnatelně při obou režimech. Znamená to, že při obou režimech byl srovnatelný pocit omezení a zároveň srovnatelná vůle k redukci hmotnosti. Disinhibice se snížila srovnatelně při obou režimech. To znamená, že se u účastníků studie snížila potřeba řešit např. stresové situace přejídáním. Pocity hladu se významně snížily pouze při dvou jídlech denně, zatímco během režimu se 6 – ti jídly denně se nezměnily. Větší pokles pocitů hladu při režimu B2 naznačuje, že je jednodušší dodržovat dietní režim o velké snídani a obědu ve srovnání s dietou A6 s více menšími porcemi během dne. Snížení pocitů hladu při dietě s menší frekvencí jídel dokazují i jiné studie [Munsters and Saris, 2012, Ohkawara et al., 2013]. Možným vysvětlením je větší snížení hladiny ghrelinu po větším jídle [Munsters and Saris, 2012], což navodí pocit sytosti. Naše výsledky naznačují, že dieta s velkou snídaní a obědem může být pro diabetiky 2. typu prospěšnější než šest menších jídel během dne.

Složení mastných kyselin (FA) ve fosfolipidech buněčných membrán může ovlivňovat buněčné funkce včetně vazby inzulinu na inzulinové receptory a intracelulární účinek inzulinu [Riserus, 2008]. Složení FA ve fosfolipidech séra koreluje se složením FA buněčných membrán [Riserus, 2008]. Předcházející práce ukázaly pozitivní vztahy mezi obsahem kyseliny linolové a účinkem inzulinu testovaným pomocí clampové techniky. Naopak obsah satureovaných FA koreloval s účinkem inzulinu negativně [Pelikanova et al., 2001, Pelikanova

et al., 1989]. Proto jsme se v dalších analýzách zaměřili na otázku, jaký je efekt frekvence jídel na složení FA ve fosfolipidech séra a zda se případné změny mohou podílet na výše uvedených příznivých účincích režimu se dvěma jídly denně. Ověřovali jsme hypotézu, zda zvýšení inzulinové senzitivity sledované po režimu se dvěma jídly denně bude provázáno i změnou v zastoupení FA v sérových fosfolipidech. Zejména zda bude patrný pokles v zastoupení nasycených mastných kyselin (se současně sníženým poměrem nasycených k nenasyceným FA) a zvýšení zastoupení kyseliny linolové. Inzulínová rezistence je často spojována s větším zastoupením palmitové, palmitolejové a nižším zastoupením linolové kyseliny [Stefan et al., 2010, Vessby et al., 2002]. Zjistili jsme, že při obou jídelních režimech nasycené mastné kyseliny (zejména kyselina myristová a palmitová) v uvedené frakci klesají a n-6 polynenasycené mastné kyseliny, včetně kyseliny linolové, naopak stoupají. Tyto pozitivní změny jsou významně větší při režimu se dvěma jídly. Obsah monoenoových mastných kyselin klesá a obsah n-3 polynenasycených mastných kyselin významně stoupá srovnatelně při obou jídelních režimech. Zvýšení obsahu kyseliny linolové bylo pozitivně asociováno se zvýšením účinku inzulínu, který jsme testovali pomocí OGIS. Tato korelace přetrvávala i po adjustaci na změny v BMI. Z našich výsledků je zřejmé, že kromě tuku v potravě může složení FA ve fosfolipidech séra ovlivňovat i frekvence jídel. Vzhledem k tomu, že oba dietní režimy byly identické z hlediska složení a absolutního obsahu jednotlivých FA, je pravděpodobné, že nalezené rozdíly ve spektrech FA jsou v souvislosti se změnou metabolismu FA (syntéza, elongace, desaturace, oxidace, transport) [Haag and Dippenaar, 2005]. Ke zjištění přesného mechanismu by byly zapotřebí další studie. Dieta se dvěma jídly denně vedla k významně vyššímu vzestupu kyseliny linolové ve fosfolipidech séra než dieta se šesti jídly denně. Toto zvýšení kyseliny linolové může částečně vysvětlovat námi nalezený inzulinsenzitizující účinek diety s nižší frekvencí jídel. Přesný mechanismus, který by vysvětlil, jak složení sérových fosfolipidů ovlivňuje účinek inzulínu, se nezná. Pravděpodobně, současná změna v zastoupení FA ve fosfolipidech membrán, může změnit i funkce samotné buněčné membrány a tedy i účinek inzulínu [Storlien et al., 1996]. V prospektivní studii byl u mužů, kteří měli vlivem vysokého příjmu linolové kyseliny v dietě i vysoké zastoupení této FA v sérových fosfolipidech, prokázáno nižší riziko rozvoje DM2 [Vessby et al., 1994]. To je i v souladu s epidemiologickými daty [Feskens, 2001], které naznačují, že jedinci s nízkým zastoupením kyseliny linolové v dietě mají vyšší riziko rozvoje DM2.

4. Souhrn hlavních výsledků

Studie A: Bazální i postprandiální koncentrace glukózy a inzulínu v plasmě byly významně vyšší u pacientů s DM2 oproti kontrolní skupině zdravých jedinců ($p < 0,001$). Koncentrace ghrelinu byly významně nižší u pacientů s DM2 po celou dobu testu ($p < 0,001$). Rovněž bazální i postprandiální koncentrace téměř všech ostatních GIH a látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS) byly u pacientů s DM2 významně zvýšeny ($p < 0,001$). Zatímco kyselina askorbová, redukovaný glutathion a aktivita superoxid dismutázy byly nižší u pacientů s DM2 v porovnání se zdravými kontrolami ($p < 0,001$). Vysokotuková snídane byla ve srovnání s vysokosacharidovou provázena vyšší postprandiální hladinou sérových lipidů ($p < 0,001$) u obou testovaných skupin. U diabetiků vedla navíc k perzistující postprandiální hyperinzulinémii. Plocha pod křivkou glukózy (AUC) byla srovnatelná po vysokotukové vs. vysokosacharidové dietě, rozdíl byl pouze v maximální koncentraci (peak) glukózy, který byl logicky vyšší u snídane bohaté na sacharidy ($p < 0,01$). U zdravých osob vysokotuková snídane více stimulovala sekreci vybraných GIH než snídane vysokosacharidová (gastric inhibitory polypeptide (GIP): $p < 0,001$; peptide YY (PYY): $p < 0,05$; pancreatic polypeptide (PP): $p < 0,01$). Naproti tomu u nemocných s diabetem byla reakce GIH zcela opačná s vyšší koncentrací po vysokosacharidovém podnětu (glucagon-like peptide-1 (GLP-1): $p < 0,001$; GIP: $p < 0,001$; PYY: $p < 0,05$; PP: $p < 0,05$). Vysokotuková snídane byla u nemocných s diabetem provázena vyšším vzestupem markerů oxidačního stresu (TBARS: $p < 0,05$).

Studie B: Lačná glykémie se snížila při obou dietních režimech ($p < 0,001$), více při B2 ($p = 0,004$). Obsah tuku v játrech se významně snížil při obou jídelních režimech ($p < 0,001$), více při B2 ($p = 0,03$). Body-mass-index (BMI) se snížil při obou režimech ($p < 0,001$), více při B2 ($p < 0,001$). REE klesl při obou režimech ($p < 0,001$) s trendem k většímu poklesu při A6 ($p = 0,3$). Zjistili jsme, že při obou jídelních režimech sérové hladiny nasycených mastných kyselin (zejména kyseliny palmitové) v uvedené frakci klesají ($p < 0,001$) a n-6 polynenasycených mastných kyselin, včetně kyseliny linolové, naopak stoupají ($p < 0,001$). Tyto pozitivní změny jsou významně větší při režimu se dvěma jídly ($p < 0,001$). Koncentrace glukagonu v plasmě se zvýšila při režimu A6 ($p = 0,04$) a klesla při B2 ($p < 0,001$), s významným rozdílem mezi dietami ($p < 0,001$). Pocity hladu se významně snížily ($p < 0,001$) pouze při dvou jídlech denně, zatímco během režimu se 6 - ti jídly denně se nezměnily (rozdíl mezi režimy: $p < 0,001$). Leptin a GIP se snížily ($p < 0,05$ pro obojí) srovnatelně při obou režimech. Koncentrace ghrelinu na lačno se po obou intervencích významně změnila

($p < 0,01$), při režimu A6 ($p < 0,001$) se snížila, při režimu B2 došlo ke zvýšení ($p = 0,023$). Pokles ghrelinu po jídle koreloval pozitivně s hladinou ghrelinu nalačno ($r = 0,9$, $p < 0,001$).

5. Závěry disertační práce

Uvedená data potvrdila, že u pacientů s DM2 je postprandiálně vyšší oxidační stres a koncentrace většiny gastrointestinálních peptidů v porovnání se zdravými kontrolami. Celková glykemická odpověď na izokalorický potravinový podnět (vysokotuková vs. vysokosacharidová snídane) je srovnatelná přes různý obsah sacharidů, a to jak u zdravých tak diabetických osob. Vysokotuková snídane bohatá na nasycené tuky a bílkoviny je ve srovnání s vysokosacharidovou dietou provázena vyšší sekrecí gastrointestinálních hormonů, perzistující hyperinzulinémií a oxidačním stresem, který je akcentován zejména u nemocných s diabetem. To bylo i v souladu s naší hypotézou. Složení potravinového podnětu (obsah tuků a bílkovin) spolu s energetickou náloží jsou důležitějšími faktory, než jen samotný obsah sacharidů, které ovlivňují postprandiální stav a které je nutné brát v úvahu při kalkulaci diabetické diety.

Kromě složení doporučené diety je důležitá i četnost jídel v průběhu dne. Při dietě se sníženým energetickým obsahem jsme prokázali, že u pacientů s DM2 hraje důležitou roli i frekvence jídel. Hypokalorická dieta rozdělená do dvou jídel denně vedla u nemocných s diabetem k většímu snížení tělesné hmotnosti a poklesu obsahu tuku v játrech, nižší sérové hladině glykémie nalačno, c-peptidu, glukagonu a nižší inzulínové rezistenci než dieta se stejnou kalorickou restrikcí rozdělená do šesti menších porcí. Nižší pokles energetického výdeje při režimu dvou jídel denně a metabolicky příznivé změny ve složení mastných kyselin ve fosfolipidech séra jsou v souladu s naší hypotézou a mohly by být jedním z potenciálních mechanismů, které se uplatňují na příznivém efektu snížení počtu porcí denně u diabetiků. Dieta s menší frekvencí jídel měla zároveň příznivější vliv na depresivní symptomy a pocity hladu. Prokázali jsme, že frekvence jídel ovlivňuje koncentraci ghrelinu nalačno i jeho postprandiální pokles. Sledované rozdíly v koncentraci ghrelinu nalačno i postprandiálně by mohly vysvětlit naše zjištěné snížení pocitu hladu během dne při dodržování diety s nižší frekvencí jídel.

Naše výsledky naznačují, že pro diabetiky 2. typu by mohlo být výhodnější v rámci redukčního režimu konzumovat méně jídel denně než je běžně doporučováno.

6. Summary of main outcomes

Study A: Both basal and postprandial plasma concentrations of glucose and insulin were significantly higher in patients with T2D ($p < 0.001$). Plasma concentrations of ghrelin were significantly lower in patients with T2D during the whole meal test ($p < 0.001$). Both basal and postprandial concentrations of almost all other gastrointestinal hormones and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were significantly increased ($p < 0.001$) while ascorbic acid, reduced glutathione and superoxide dismutase activity were decreased in patients with T2D compared to healthy controls ($p < 0.001$). The meal rich in saturated fat resulted in a higher postprandial increase in lipids in both groups ($p < 0.001$) and persistent postprandial hyperinsulinemia in diabetics ($p < 0.001$). The plasma glucose levels were significantly higher after the meal rich in carbohydrates only at the peak level ($p < 0.01$). The area under the curve of glucose (AUC) was comparable after the meal rich in saturated fat vs the meal rich in carbohydrates in both groups (10.6 ± 0.13 vs 11.2 ± 0.15 in healthy controls; 21.58 ± 1.6 vs 22.28 ± 1.7 mmol/l in patients with T2D). The concentrations of gastric inhibitory polypeptide (GIP), peptide YY (PYY) and pancreatic polypeptide (PP) were higher ($p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.001$ respectively) and the ghrelin concentration was lower ($p < 0.001$) after the meal rich in saturated fat in healthy subjects. In contrast, the concentrations of GIH were significantly lower after the meal rich in saturated fat in diabetic patients (glucagon-like peptide-1 (GLP-1): $p < 0.001$; GIP: $p < 0.001$; PYY: $p < 0.05$; PP: $p < 0.05$). Compared with the meal rich in carbohydrates, the meal rich in saturated fat was associated with a larger increase in lipoperoxidation products (TBARS) in T2D patients ($p < 0.05$).

Study B: Fasting blood glucose decreased in both regimens ($p < 0.001$), more in B2 ($p = 0.004$). The hepatic fat content was significantly reduced in both regimens ($p < 0.001$), more in B2 ($p = 0.03$). Body-mass-index (BMI) was reduced in both regimens ($p < 0.001$), more in B2 ($p < 0.001$). REE decreased in both regimens ($p < 0.001$) with a trend towards greater decrease in A6 ($p = 0.3$). Saturated fatty acids (particularly palmitic acid) decreased ($p < 0.001$), while n-6 polyunsaturated fatty acids, including linoleic acid, increased ($P < 0.001$) in both hypocaloric regimens. These positive changes were significantly greater in B2 ($p < 0.001$). Glucagon plasma levels increased in regimen A6 ($p = 0.04$) and decreased in B2 ($p < 0.001$), the difference between diets was significant ($p < 0.001$). Feelings of hunger were only reduced in the regimen B2 ($p < 0.001$), while during the regimen A6 did not change (the difference between diets: $p < 0.001$). Leptin and GIP decreased ($p < 0.05$ for both) equally in both regimens. Fasting plasma levels of ghrelin changed in both interventions ($p < 0.05$).

Fasting plasma levels of ghrelin decreased in A6 and increased in B2 with significant difference between both diet regimens ($p=0.023$). The postprandial drop in ghrelin levels correlated positively with its fasting level ($r=0.9$, $p<0.001$).

7. Conclusions

Our data confirmed increased postprandial oxidative stress and increased postprandial concentrations of most gastrointestinal peptides in patients with T2D compared to healthy controls. The plasma glucose levels were significantly higher after the meal rich in carbohydrates only at the peak level. Compared with the vegan meal rich in carbohydrates, the processed meat meal rich in saturated fat and protein was associated with increased secretion of GIHs and larger increase in oxidative stress and persistent postprandial hyperinsulinemia in diabetic patients, according to our hypothesis. Our results suggest that the diet composition and the energy content, rather than the carbohydrate count, should be important considerations for dietary management.

In patients with T2D less frequent eating (breakfast and lunch consumption) reduced body weight, feelings of hunger, hepatic fat content, fasting plasma glucose, C-peptide, glucagon and insulin resistance more than a diet with the same caloric restriction divided into six more frequent meals. The basal metabolism interference and changes in the composition of fatty acids in serum phospholipids could be one of the potential mechanisms of the favorable effect of reducing the number of meals per day in patients with T2D. Eating only breakfast and lunch increased fasting plasma ghrelin more than the same caloric restriction split into six meals. The changes in fasting ghrelin correlated negatively with the decrease in body weight. Our data suggest that eating a larger breakfast and lunch may be more beneficial for a long-term adherence than to apportion a hypocaloric diet into smaller meals during the day for patients with T2D.

8. Seznam použitých zkratek

ATP adenosintrifosfát
DAG diacylglycerol
DM1 diabetes mellitus 1. typu
DM2 diabetes mellitus 2. typu
eNOS endoteliální syntázy oxidu dusnatého
EODF každý druhý den půst (every-other-day fasting)
ET-1 endothelin 1
FA mastné kyseliny
FFA volné mastné kyseliny (free fatty acids)
GAPDH glyceraldehydfosfátdehydrogenáza
GIH gastrointestinální hormony
GIP gastric inhibitory polypeptide
GLP-1 glucagon-like peptide-1
GLUT1 glukózový transportér 1
GLUT2 glukózový transportér 2
GLUT4 glukózový transportér 4
HbA1c glykovaný hemoglobin
HFC obsah tuku v játrech (hepatic fat content)
HO-1 heme oxygenase 1
IR inzulinová rezistence
MUFA mononenasycené mastné kyseliny (monounsaturated fatty acids)
NO oxid dusnatý
PKC proteinkináza C
PP pancreatic polypeptide
PUFA polynenasycené mastné kyseliny (polyunsaturated fatty acids)
PYY peptide YY; peptide tyrosine tyrosine; pancreatic peptide YY
ROS reaktivní formy kyslíku
SAFA nasycené mastné kyseliny (saturated fatty acids)
TAG triacylglyceroly
TBARS substance reagující s kyselinou thiobarbiturovou (thiobarbituric acid reactive substances)
VCAM-1 vascular cell adhesion molecule 1
VEGF vascular endothelial growth factor

9. Seznam použité literatury

1. ADA. Standards of medical care in diabetes--2013. *Diabetes care*. 2013 Jan;36 Suppl 1:S11-66. PubMed PMID: 23264422. Pubmed Central PMCID: 3537269.
2. Adrian TE, Ferri GL, Bacarese-Hamilton AJ, Fuessl HS, Polak JM, Bloom SR. Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology*. 1985 Nov;89(5):1070-7. PubMed PMID: 3840109.
3. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annual review of physiology*. 2000;62:413-37. PubMed PMID: 10845097.
4. American Diabetes A. Standards of medical care in diabetes--2013. *Diabetes care*. 2013 Jan;36 Suppl 1:S11-66. PubMed PMID: 23264422. Pubmed Central PMCID: 3537269.
5. Ampudia-Blasco FJ, Ceriello A. [Importance of daily glycemic variability in achieving glycemic targets in type 2 diabetes: role of DPP-4 inhibitors]. *Medicina clinica*. 2010 Sep;135 Suppl 2:33-9. PubMed PMID: 21420536. Importancia de la variabilidad del control glucémico diario en la consecución de los objetivos de control en la diabetes mellitus tipo 2: papel de los inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4.
6. Anderson RA, Evans LM, Ellis GR, Khan N, Morris K, Jackson SK, et al. Prolonged deterioration of endothelial dysfunction in response to postprandial lipaemia is attenuated by vitamin C in Type 2 diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2006 Mar;23(3):258-64. PubMed PMID: 16492208.
7. Anson RM, Guo Z, de Cabo R, Iyun T, Rios M, Hagepanos A, et al. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 May 13;100(10):6216-20. PubMed PMID: 12724520. Pubmed Central PMCID: 156352.
8. Anson RM, Jones B, de Cabod R. The diet restriction paradigm: a brief review of the effects of every-other-day feeding. *Age*. 2005 Mar;27(1):17-25. PubMed PMID: 23598600. Pubmed Central PMCID: 3456096.
9. Arble DM, Bass J, Laposky AD, Vitaterna MH, Turek FW. Circadian timing of food intake contributes to weight gain. *Obesity*. 2009 Nov;17(11):2100-2. PubMed PMID: 19730426. Pubmed Central PMCID: 3499064.
10. Arnold L, Mann JJ, Ball MJ. Metabolic effects of alterations in meal frequency in type 2 diabetes. *Diabetes care*. 1997 Nov;20(11):1651-4. PubMed PMID: 9353602.
11. Aronne L, Fujioka K, Aroda V, Chen K, Halseth A, Kestey NC, et al. Progressive reduction in body weight after treatment with the amylin analog pramlintide in obese subjects: a phase 2, randomized, placebo-controlled, dose-escalation study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007 Aug;92(8):2977-83. PubMed PMID: 17504894.
12. Bagger JJ, Knop FK, Lund A, Holst JJ, Vilsboll T. Glucagon responses to increasing oral loads of glucose and corresponding isoglycaemic intravenous glucose infusions in patients with type 2 diabetes and healthy individuals. *Diabetologia*. 2014 Aug;57(8):1720-5. PubMed PMID: 24879388.
13. Bachman JL, Raynor HA. Effects of manipulating eating frequency during a behavioral weight loss intervention: a pilot randomized controlled trial. *Obesity*. 2012 May;20(5):985-92. PubMed PMID: 22173575.
14. Bajaj M, DeFronzo RA. Metabolic and molecular basis of insulin resistance. *Journal of nuclear cardiology : official publication of the American Society of Nuclear Cardiology*. 2003 May-Jun;10(3):311-23. PubMed PMID: 12794631.
15. Bajaj M, Pratipanawatr T, Berria R, Pratipanawatr W, Kashyap S, Cusi K, et al. Free fatty acids reduce splanchnic and peripheral glucose uptake in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002 Oct;51(10):3043-8. PubMed PMID: 12351445.
16. Bajaj M, Suraamornkul S, Kashyap S, Cusi K, Mandarino L, DeFronzo RA. Sustained reduction in plasma free fatty acid concentration improves insulin action without altering plasma adipocytokine levels in subjects with strong family history of type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004 Sep;89(9):4649-55. PubMed PMID: 15356076.
17. Baron AD, Schaeffer L, Shragg P, Kolterman OG. Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics. *Diabetes*. 1987 Mar;36(3):274-83. PubMed PMID: 2879757.
18. Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS, et al. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *The New England journal of medicine*. 2003 Sep 04;349(10):941-8. PubMed PMID: 12954742.
19. Batterham RL, ffytche DH, Rosenthal JM, Zelaya FO, Barker GJ, Withers DJ, et al. PYY modulation of cortical and hypothalamic brain areas predicts feeding behaviour in humans. *Nature*. 2007 Nov 01;450(7166):106-9. PubMed PMID: 17934448.
20. Batterham RL, Le Roux CW, Cohen MA, Park AJ, Ellis SM, Patterson M, et al. Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003 Aug;88(8):3989-92. PubMed PMID: 12915697.

21. Beisswenger PJ, Howell SK, O'Dell RM, Wood ME, Touchette AD, Szwegold BS. alpha-Dicarbonyls increase in the postprandial period and reflect the degree of hyperglycemia. *Diabetes care*. 2001 Apr;24(4):726-32. PubMed PMID: 11315838.
22. Belinova L, Kahleova H, Malinska H, Topolcan O, Vrzalova J, Oliyarnyk O, et al. Differential acute postprandial effects of processed meat and isocaloric vegan meals on the gastrointestinal hormone response in subjects suffering from type 2 diabetes and healthy controls: a randomized crossover study. *PloS one*. 2014;9(9):e107561. PubMed PMID: 25222490. Pubmed Central PMCID: 4164634.
23. Bell KJ, Toschi E, Steil GM, Wolpert HA. Optimized Mealtime Insulin Dosing for Fat and Protein in Type 1 Diabetes: Application of a Model-Based Approach to Derive Insulin Doses for Open-Loop Diabetes Management. *Diabetes care*. 2016 Jul 7. PubMed PMID: 27388474.
24. Bendtsen LQ, Lorenzen JK, Bendtsen NT, Rasmussen C, Astrup A. Effect of dairy proteins on appetite, energy expenditure, body weight, and composition: a review of the evidence from controlled clinical trials. *Advances in nutrition*. 2013 Jul;4(4):418-38. PubMed PMID: 23858091. Pubmed Central PMCID: 3941822.
25. Bergman RN, Finegood DT, Kahn SE. The evolution of beta-cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes. *European journal of clinical investigation*. 2002 Jun;32 Suppl 3:35-45. PubMed PMID: 12028373.
26. Bevilacqua S, Bonadonna R, Buzzigoli G, Boni C, Ciociaro D, Maccari F, et al. Acute elevation of free fatty acid levels leads to hepatic insulin resistance in obese subjects. *Metabolism*. 1987 May;36(5):502-6. PubMed PMID: 3553852.
27. Bienertova-Vasku J, Bienert P, Forejt M, Tomandl J, Brazdova Z, Vasku A. Genotype x nutrient association of common polymorphisms in obesity-related genes with food preferences and time structure of energy intake. *The British journal of nutrition*. 2010 Feb;103(3):352-9. PubMed PMID: 19747414.
28. Blom WA, de Graaf C, Lluch A, Stafleu A, Schaafsma G, Hendriks HF. Postprandial ghrelin responses are associated with the intermeal interval in time-blinded normal weight men, but not in obese men. *Physiology & behavior*. 2009 Mar 23;96(4-5):742-8. PubMed PMID: 19385031.
29. Bretzel RG, Voigt K, Schatz H. The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) implications for the pharmacotherapy of type 2 diabetes mellitus. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 1998;106(5):369-72. PubMed PMID: 9831300.
30. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):813-20. PubMed PMID: 11742414.
31. Calanna S, Christensen M, Holst JJ, Laferrere B, Gluud LL, Vilsboll T, et al. Secretion of glucagon-like peptide-1 in patients with type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analyses of clinical studies. *Diabetologia*. 2013 May;56(5):965-72. PubMed PMID: 23377698. Pubmed Central PMCID: 3687347.
32. Campbell JE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell metabolism*. 2013 Jun 4;17(6):819-37. PubMed PMID: 23684623.
33. Cardona F, Tunez I, Tasset I, Montilla P, Collantes E, Tinahones FJ. Fat overload aggravates oxidative stress in patients with the metabolic syndrome. *European journal of clinical investigation*. 2008 Jul;38(7):510-5. PubMed PMID: 18489583.
34. Carr RD, Larsen MO, Winzell MS, Jelic K, Lindgren O, Deacon CF, et al. Incretin and islet hormonal responses to fat and protein ingestion in healthy men. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2008 Oct;295(4):E779-84. PubMed PMID: 18612044.
35. Carrel G, Egli L, Tran C, Schneiter P, Giusti V, D'Alessio D, et al. Contributions of fat and protein to the incretin effect of a mixed meal. *The American journal of clinical nutrition*. 2011 Oct;94(4):997-1003. PubMed PMID: 21849595. Pubmed Central PMCID: 3742299.
36. Cavallero E, Dachet C, Neufcour D, Wirquin E, Mathe D, Jacotot B. Postprandial amplification of lipoprotein abnormalities in controlled type II diabetic subjects: relationship to postprandial lipemia and C-peptide/glucagon levels. *Metabolism*. 1994 Mar;43(3):270-8. PubMed PMID: 8139473.
37. Cavalot F, Pagliarino A, Valle M, Di Martino L, Bonomo K, Massucco P, et al. Postprandial blood glucose predicts cardiovascular events and all-cause mortality in type 2 diabetes in a 14-year follow-up: lessons from the San Luigi Gonzaga Diabetes Study. *Diabetes care*. 2011 Oct;34(10):2237-43. PubMed PMID: 21949221. Pubmed Central PMCID: 3177732.
38. Cavalot F, Petrelli A, Traversa M, Bonomo K, Fiora E, Conti M, et al. Postprandial blood glucose is a stronger predictor of cardiovascular events than fasting blood glucose in type 2 diabetes mellitus, particularly in women: lessons from the San Luigi Gonzaga Diabetes Study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006 Mar;91(3):813-9. PubMed PMID: 16352690.
39. Ceriello A. The possible role of postprandial hyperglycaemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetologia*. 2003 Mar;46 Suppl 1:M9-16. PubMed PMID: 12652353.
40. Ceriello A. Does postprandial blood glucose matter and why? *Endocrinologia y nutricion : organo de la Sociedad Espanola de Endocrinologia y Nutricion*. 2009 Dec;56 Suppl 4:8-11. PubMed PMID: 20629222.

41. Ceriello A. Point: postprandial glucose levels are a clinically important treatment target. *Diabetes care*. 2010 Aug;33(8):1905-7. PubMed PMID: 20668158. Pubmed Central PMCID: 2909084.
42. Ceriello A, Bortolotti N, Motz E, Crescentini A, Lizzio S, Russo A, et al. Meal-generated oxidative stress in type 2 diabetic patients. *Diabetes care*. 1998 Sep;21(9):1529-33. PubMed PMID: 9727904.
43. Ceriello A, Bortolotti N, Motz E, Pieri C, Marra M, Tonutti L, et al. Meal-induced oxidative stress and low-density lipoprotein oxidation in diabetes: the possible role of hyperglycemia. *Metabolism*. 1999 Dec;48(12):1503-8. PubMed PMID: 10599980.
44. Ceriello A, Esposito K, Testa R, Bonfigli AR, Marra M, Giugliano D. The possible protective role of glucagon-like peptide 1 on endothelium during the meal and evidence for an "endothelial resistance" to glucagon-like peptide 1 in diabetes. *Diabetes care*. 2011 Mar;34(3):697-702. PubMed PMID: 21273492. Pubmed Central PMCID: 3041210.
45. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004 May;24(5):816-23. PubMed PMID: 14976002.
46. Ceriello A, Quagliaro L, Catone B, Pascon R, Piazzola M, Bais B, et al. Role of hyperglycemia in nitrotyrosine postprandial generation. *Diabetes care*. 2002 Aug;25(8):1439-43. PubMed PMID: 12145247.
47. Ceriello A, Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, et al. Effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on circulating adhesion molecules and oxidative stress generation and the possible role of simvastatin treatment. *Diabetes*. 2004 Mar;53(3):701-10. PubMed PMID: 14988255.
48. Cernea S. The role of incretin therapy at different stages of diabetes. The review of diabetic studies : RDS. 2011 Fall;8(3):323-38. PubMed PMID: 22262070. Pubmed Central PMCID: 3280667.
49. Clore JN, Stillman J, Sugerman H. Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2000 Jun;49(6):969-74. PubMed PMID: 10866049.
50. Colette C, Monnier L. Acute glucose fluctuations and chronic sustained hyperglycemia as risk factors for cardiovascular diseases in patients with type 2 diabetes. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2007 Sep;39(9):683-6. PubMed PMID: 17846977.
51. Cummings DE, Frayo RS, Marmonier C, Aubert R, Chapelot D. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2004 Aug;287(2):E297-304. PubMed PMID: 15039149.
52. Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, et al. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *The New England journal of medicine*. 2002 May 23;346(21):1623-30. PubMed PMID: 12023994.
53. D'Alessio D. The role of dysregulated glucagon secretion in type 2 diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2011 Oct;13 Suppl 1:126-32. PubMed PMID: 21824266.
54. de Luis DA, Gonzalez Sagrado M, Conde R, Aller R, Izaola O. Decreased basal levels of glucagon-like peptide-1 after weight loss in obese subjects. *Annals of nutrition & metabolism*. 2007;51(2):134-8. PubMed PMID: 17536190.
55. de Luis DA, Sagrado MG, Conde R, Aller R, Izaola O. Changes of ghrelin and leptin in response to hypocaloric diet in obese patients. *Nutrition*. 2008 Feb;24(2):162-6. PubMed PMID: 18165128.
56. DECODE. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. The DECODE study group. European Diabetes Epidemiology Group. *Diabetes Epidemiology: Collaborative analysis Of Diagnostic criteria in Europe*. *Lancet*. 1999 Aug 21;354(9179):617-21. PubMed PMID: 10466661.
57. Decode Study Group tDEEG. Glucose tolerance and cardiovascular mortality: comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria. *Archives of internal medicine*. 2001 Feb 12;161(3):397-405. PubMed PMID: 11176766.
58. DeFronzo RA. Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. *International journal of clinical practice Supplement*. 2004 Oct(143):9-21. PubMed PMID: 16035392.
59. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *The Medical clinics of North America*. 2004 Jul;88(4):787-835, ix. PubMed PMID: 15308380.
60. DeFronzo RA, Ferrannini E, Simonson DC. Fasting hyperglycemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus: contributions of excessive hepatic glucose production and impaired tissue glucose uptake. *Metabolism*. 1989 Apr;38(4):387-95. PubMed PMID: 2657323.
61. DelParigi A, Tschop M, Heiman ML, Salbe AD, Vozarova B, Sell SM, et al. High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in prader-willi syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002 Dec;87(12):5461-4. PubMed PMID: 12466337.
62. DePaula AL, Macedo AL, Rassi N, Machado CA, Schraibman V, Silva LQ, et al. Laparoscopic treatment of type 2 diabetes mellitus for patients with a body mass index less than 35. *Surgical endoscopy*. 2008 Mar;22(3):706-16. PubMed PMID: 17704886.

63. Diamond MP, Thornton K, Connolly-Diamond M, Sherwin RS, DeFronzo RA. Reciprocal variations in insulin-stimulated glucose uptake and pancreatic insulin secretion in women with normal glucose tolerance. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 1995 Sep-Oct;2(5):708-15. PubMed PMID: 9420879.
64. Dickson SL, Eggecioglu E, Landgren S, Skibicka KP, Engel JA, Jerlhag E. The role of the central ghrelin system in reward from food and chemical drugs. *Molecular and cellular endocrinology*. 2011 Jun 20;340(1):80-7. PubMed PMID: 21354264.
65. Dinneen S, Gerich J, Rizza R. Carbohydrate metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England journal of medicine*. 1992 Sep 3;327(10):707-13. PubMed PMID: 1495524.
66. Duthie GG, Morrice PC, Ventresca PG, McLay JS. Effects of storage, iron and time of day on indices of lipid peroxidation in plasma from healthy volunteers. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1992 Mar 31;206(3):207-13. PubMed PMID: 1606707.
67. Duval K, Strychar I, Cyr MJ, Prud'homme D, Rabasa-Lhoret R, Doucet E. Physical activity is a confounding factor of the relation between eating frequency and body composition. *The American journal of clinical nutrition*. 2008 Nov;88(5):1200-5. PubMed PMID: 18996853.
68. Edwards KL, Stapleton M, Weis J, Irons BK. An update in incretin-based therapy: a focus on glucagon-like peptide-1 receptor agonists. *Diabetes technology & therapeutics*. 2012 Oct;14(10):951-67. PubMed PMID: 22845681.
69. English PJ, Ashcroft A, Patterson M, Dovey TM, Halford JC, Harrison J, et al. Fasting plasma peptide-YY concentrations are elevated but do not rise postprandially in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2006 Sep;49(9):2219-21. PubMed PMID: 16832662.
70. English PJ, Ghatei MA, Malik IA, Bloom SR, Wilding JP. Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002 Jun;87(6):2984. PubMed PMID: 12050284.
71. Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Jobst EE, Tonelli-Lemos L, Billes SK, et al. Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell metabolism*. 2007 Mar;5(3):181-94. PubMed PMID: 17339026.
72. Essah PA, Levy JR, Sistrun SN, Kelly SM, Nestler JE. Effect of macronutrient composition on postprandial peptide YY levels. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007 Oct;92(10):4052-5. PubMed PMID: 17726080.
73. Estrich D, Ravnik A, Schlierf G, Fukayama G, Kinsell L. Effects of Co-ingestion of fat and protein upon carbohydrate-induced hyperglycemia. *Diabetes*. 1967 Apr;16(4):232-7. PubMed PMID: 6023165.
74. Feinle-Bisset C, Patterson M, Ghatei MA, Bloom SR, Horowitz M. Fat digestion is required for suppression of ghrelin and stimulation of peptide YY and pancreatic polypeptide secretion by intraduodenal lipid. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2005 Dec;289(6):E948-53. PubMed PMID: 15998659.
75. Felber JP, Ferrannini E, Golay A, Meyer HU, Theibaud D, Curchod B, et al. Role of lipid oxidation in pathogenesis of insulin resistance of obesity and type II diabetes. *Diabetes*. 1987 Nov;36(11):1341-50. PubMed PMID: 3311856.
76. Fernandez-Garcia JC, Murri M, Coin-Araguez L, Alcaide J, El Bekay R, Tinahones FJ. GLP-1 and peptide YY secretory response after fat load is impaired by insulin resistance, impaired fasting glucose and type 2 diabetes in morbidly obese subjects. *Clinical endocrinology*. 2014 May;80(5):671-6. PubMed PMID: 23573808.
77. Fernemark H, Jaredsson C, Bunjaku B, Rosenqvist U, Nystrom FH, Guldbrand H. A randomized cross-over trial of the postprandial effects of three different diets in patients with type 2 diabetes. *PloS one*. 2013;8(11):e79324. PubMed PMID: 24312178. Pubmed Central PMCID: 3842308.
78. Ferrannini E, Simonson DC, Katz LD, Reichard G, Jr., Bevilacqua S, Barrett EJ, et al. The disposal of an oral glucose load in patients with non-insulin-dependent diabetes. *Metabolism*. 1988 Jan;37(1):79-85. PubMed PMID: 3275860.
79. Feskens EJ. Can diabetes be prevented by vegetable fat? *Diabetes care*. 2001 Sep;24(9):1517-8. PubMed PMID: 11522691.
80. Feskens EJ, Virtanen SM, Rasanen L, Tuomilehto J, Stengard J, Pekkanen J, et al. Dietary factors determining diabetes and impaired glucose tolerance. A 20-year follow-up of the Finnish and Dutch cohorts of the Seven Countries Study. *Diabetes care*. 1995 Aug;18(8):1104-12. PubMed PMID: 7587845.
81. Florez JC. Newly identified loci highlight beta cell dysfunction as a key cause of type 2 diabetes: where are the insulin resistance genes? *Diabetologia*. 2008 Jul;51(7):1100-10. PubMed PMID: 18504548.
82. Garaulet M, Gomez-Abellan P, Albuquerque-Bejar JJ, Lee YC, Ordovas JM, Scheer FA. Timing of food intake predicts weight loss effectiveness. *International journal of obesity*. 2013 Apr;37(4):604-11. PubMed PMID: 23357955. Pubmed Central PMCID: 3756673.
83. Garaulet M, Madrid JA. Chronobiological aspects of nutrition, metabolic syndrome and obesity. *Advanced drug delivery reviews*. 2010 Jul 31;62(9-10):967-78. PubMed PMID: 20580916.

84. Gastaldelli A, Baldi S, Pettiti M, Toschi E, Camastra S, Natali A, et al. Influence of obesity and type 2 diabetes on gluconeogenesis and glucose output in humans: a quantitative study. *Diabetes*. 2000 Aug;49(8):1367-73. PubMed PMID: 10923639.
85. Gentilcore D, Chaikomin R, Jones KL, Russo A, Feinle-Bisset C, Wishart JM, et al. Effects of fat on gastric emptying of and the glycemic, insulin, and incretin responses to a carbohydrate meal in type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006 Jun;91(6):2062-7. PubMed PMID: 16537685.
86. Gerich JE. Is reduced first-phase insulin release the earliest detectable abnormality in individuals destined to develop type 2 diabetes? *Diabetes*. 2002 Feb;51 Suppl 1:S117-21. PubMed PMID: 11815469.
87. Gerner T, Johansen OE, Olufsen M, Torjesen PA, Tveit A. The post-prandial pattern of gut hormones is related to magnitude of weight-loss following gastric bypass surgery: a case-control study. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2014 Apr;74(3):213-8. PubMed PMID: 24472033.
88. Gormsen LC, Nielsen C, Jessen N, Jorgensen JO, Moller N. Time-course effects of physiological free fatty acid surges on insulin sensitivity in humans. *Acta physiologica*. 2011 Mar;201(3):349-56. PubMed PMID: 20731625.
89. Groop L, Lyssenko V. Genes and type 2 diabetes mellitus. *Current diabetes reports*. 2008 Jun;8(3):192-7. PubMed PMID: 18625115.
90. Groop LC, Bonadonna RC, DelPrato S, Ratheiser K, Zyck K, Ferrannini E, et al. Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 1989 Jul;84(1):205-13. PubMed PMID: 2661589. Pubmed Central PMCID: 303971.
91. Haag M, Dippenaar NG. Dietary fats, fatty acids and insulin resistance: short review of a multifaceted connection. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2005 Dec;11(12):RA359-67. PubMed PMID: 16319806.
92. Hagemann D, Holst JJ, Gethmann A, Banasch M, Schmidt WE, Meier JJ. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) suppresses ghrelin levels in humans via increased insulin secretion. *Regulatory peptides*. 2007 Oct 4;143(1-3):64-8. PubMed PMID: 17434608.
93. Hamed EA, Zakary MM, Ahmed NS, Gamal RM. Circulating leptin and insulin in obese patients with and without type 2 diabetes mellitus: relation to ghrelin and oxidative stress. *Diabetes research and clinical practice*. 2011 Dec;94(3):434-41. PubMed PMID: 21924513.
94. Hanefeld M, Fischer S, Julius U, Schulze J, Schwanebeck U, Schmechel H, et al. Risk factors for myocardial infarction and death in newly detected NIDDM: the Diabetes Intervention Study, 11-year follow-up. *Diabetologia*. 1996 Dec;39(12):1577-83. PubMed PMID: 8960845.
95. Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, DiTacchio L, Bushong EA, Gill S, et al. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell metabolism*. 2012 Jun 06;15(6):848-60. PubMed PMID: 22608008. Pubmed Central PMCID: 3491655.
96. Hellstrom L, Wahrenberg H, Hruska K, Reynisdottir S, Arner P. Mechanisms behind gender differences in circulating leptin levels. *Journal of internal medicine*. 2000 Apr;247(4):457-62. PubMed PMID: 10792559.
97. Hickey MS, Israel RG, Gardiner SN, Considine RV, McCammon MR, Tyndall GL, et al. Gender differences in serum leptin levels in humans. *Biochemical and molecular medicine*. 1996 Oct;59(1):1-6. PubMed PMID: 8902186.
98. Hodson L, Skeaff CM, Fielding BA. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Progress in lipid research*. 2008 Sep;47(5):348-80. PubMed PMID: 18435934.
99. Hou X, Sun L, Li Z, Mou H, Yu Z, Li H, et al. Associations of amylin with inflammatory markers and metabolic syndrome in apparently healthy Chinese. *PloS one*. 2011;6(9):e24815. PubMed PMID: 21935471. Pubmed Central PMCID: 3174205.
100. Howarth NC, Huang TT, Roberts SB, Lin BH, McCrory MA. Eating patterns and dietary composition in relation to BMI in younger and older adults. *International journal of obesity*. 2007 Apr;31(4):675-84. PubMed PMID: 16953255.
101. Huang PL. eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2009 Aug;20(6):295-302. PubMed PMID: 19647446. Pubmed Central PMCID: 2731551.
102. Chan JL, Stoyneva V, Kelesidis T, Raciti P, Mantzoros CS. Peptide YY levels are decreased by fasting and elevated following caloric intake but are not regulated by leptin. *Diabetologia*. 2006 Jan;49(1):169-73. PubMed PMID: 16362815.
103. Chandarana K, Drew ME, Emmanuel J, Karra E, Gelegen C, Chan P, et al. Subject standardization, acclimatization, and sample processing affect gut hormone levels and appetite in humans. *Gastroenterology*. 2009 Jun;136(7):2115-26. PubMed PMID: 19233179.
104. Iepsen EW, Lundgren J, Holst JJ, Madsbad S, Torekov SS. Successful weight loss maintenance includes long-term increased meal responses of GLP-1 and PYY3-36. *European journal of endocrinology*. 2016 Jun;174(6):775-84. PubMed PMID: 26976129.

105. Ipp E. Impaired glucose tolerance: the irrepressible alpha-cell? *Diabetes care*. 2000 May;23(5):569-70. PubMed PMID: 10834408.
106. Ishii S, Osaki N, Shimotoyodome A. The Effects of a Hypocaloric Diet on Diet-Induced Thermogenesis and Blood Hormone Response in Healthy Male Adults: A Pilot Study. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 2016;62(1):40-6. PubMed PMID: 27117850.
107. Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha. *Diabetes*. 2002 Jul;51(7):2005-11. PubMed PMID: 12086926.
108. Jakubowicz D, Wainstein J, Ahren B, Bar-Dayana Y, Landau Z, Rabinovitz HR, et al. High-energy breakfast with low-energy dinner decreases overall daily hyperglycaemia in type 2 diabetic patients: a randomised clinical trial. *Diabetologia*. 2015 May;58(5):912-9. PubMed PMID: 25724569.
109. James WP. The fundamental drivers of the obesity epidemic. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2008 Mar;9 Suppl 1:6-13. PubMed PMID: 18307693.
110. Juarez-Rojas JG, Medina-Urrutia AX, Jorge-Galarza E, Gonzalez-Salazar C, Kimura-Hayama E, Cardoso-Saldana G, et al. Fatty liver increases the association of metabolic syndrome with diabetes and atherosclerosis. *Diabetes care*. 2013 Jun;36(6):1726-8. PubMed PMID: 23250798. Pubmed Central PMCID: 3661799.
111. Kahn SE, D'Alessio DA, Schwartz MW, Fujimoto WY, Ensink JW, Taborsky GJ, Jr., et al. Evidence of cosecretion of islet amyloid polypeptide and insulin by beta-cells. *Diabetes*. 1990 May;39(5):634-8. PubMed PMID: 2185112.
112. Kaiser N, Sasson S, Feener EP, Boukobza-Vardi N, Higashi S, Moller DE, et al. Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes*. 1993 Jan;42(1):80-9. PubMed PMID: 7678404.
113. Kang ZF, Deng Y, Zhou Y, Fan RR, Chan JC, Laybutt DR, et al. Pharmacological reduction of NEFA restores the efficacy of incretin-based therapies through GLP-1 receptor signalling in the beta cell in mouse models of diabetes. *Diabetologia*. 2013 Feb;56(2):423-33. PubMed PMID: 23188390. Pubmed Central PMCID: 3536946.
114. Kellar KL, Iannone MA. Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays. *Experimental hematology*. 2002 Nov;30(11):1227-37. PubMed PMID: 12423675.
115. Kelly KR, Brooks LM, Solomon TP, Kashyap SR, O'Leary VB, Kirwan JP. The glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucose-stimulated insulin response to exercise training and diet in obesity. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2009 Jun;296(6):E1269-74. PubMed PMID: 19351807. Pubmed Central PMCID: 2692394.
116. Kim BJ, Carlson OD, Jang HJ, Elahi D, Berry C, Egan JM. Peptide YY is secreted after oral glucose administration in a gender-specific manner. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005 Dec;90(12):6665-71. PubMed PMID: 16174724.
117. King GL, Buzney SM, Kahn CR, Hetu N, Buchwald S, Macdonald SG, et al. Differential responsiveness to insulin of endothelial and support cells from micro- and macrovessels. *The Journal of clinical investigation*. 1983 Apr;71(4):974-9. PubMed PMID: 6339562. Pubmed Central PMCID: 436955.
118. Kjems LL, Holst JJ, Volund A, Madsbad S. The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion: effects on beta-cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects. *Diabetes*. 2003 Feb;52(2):380-6. PubMed PMID: 12540611.
119. Knop FK, Vilsboll T, Hojberg PV, Larsen S, Madsbad S, Volund A, et al. Reduced incretin effect in type 2 diabetes: cause or consequence of the diabetic state? *Diabetes*. 2007 Aug;56(8):1951-9. PubMed PMID: 17513701.
120. Kowluru RA. Effect of reinstitution of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats. *Diabetes*. 2003 Mar;52(3):818-23. PubMed PMID: 12606525.
121. Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, et al. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation*. 2000 Feb 15;101(6):676-81. PubMed PMID: 10673261.
122. Kvapil M, Perušičová, J. . Postprandiální glykémie 1. vyd. Praha: Triton2006.
123. Larsen RN, Mann NJ, Maclean E, Shaw JE. The effect of high-protein, low-carbohydrate diets in the treatment of type 2 diabetes: a 12 month randomised controlled trial. *Diabetologia*. 2011 Apr;54(4):731-40. PubMed PMID: 21246185.
124. Larson N, Story M. A review of snacking patterns among children and adolescents: what are the implications of snacking for weight status? *Childhood obesity*. 2013 Apr;9(2):104-15. PubMed PMID: 23470091.
125. le Roux CW, Batterham RL, Aylwin SJ, Patterson M, Borg CM, Wynne KJ, et al. Attenuated peptide YY release in obese subjects is associated with reduced satiety. *Endocrinology*. 2006 Jan;147(1):3-8. PubMed PMID: 16166213.

126. Li Z, Henning SM, Zhang Y, Zerlin A, Li L, Gao K, et al. Antioxidant-rich spice added to hamburger meat during cooking results in reduced meat, plasma, and urine malondialdehyde concentrations. *The American journal of clinical nutrition*. 2010 May;91(5):1180-4. PubMed PMID: 20335545. Pubmed Central PMCID: 2854897.
127. Lutz TA. Amylinergic control of food intake. *Physiology & behavior*. 2006 Nov 30;89(4):465-71. PubMed PMID: 16697020.
128. Lutz TA. The interaction of amylin with other hormones in the control of eating. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2013 Feb;15(2):99-111. PubMed PMID: 22862822.
129. Ma Y, Bertone ER, Stanek EJ, 3rd, Reed GW, Hebert JR, Cohen NL, et al. Association between eating patterns and obesity in a free-living US adult population. *American journal of epidemiology*. 2003 Jul 01;158(1):85-92. PubMed PMID: 12835290.
130. Magnusson I, Rothman DL, Katz LD, Shulman RG, Shulman GI. Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ¹³C nuclear magnetic resonance study. *The Journal of clinical investigation*. 1992 Oct;90(4):1323-7. PubMed PMID: 1401068. Pubmed Central PMCID: 443176.
131. Malinska H, Kahleova H, Topolcan O, Vrzalova J, Oliarnyk O, Kazdova L, et al. Postprandial oxidative stress and gastrointestinal hormones: is there a link? *PloS one*. 2014;9(8):e103565. PubMed PMID: 25141237. Pubmed Central PMCID: 4139261.
132. Maron DJ, Fair JM, Haskell WL. Saturated fat intake and insulin resistance in men with coronary artery disease. The Stanford Coronary Risk Intervention Project Investigators and Staff. *Circulation*. 1991 Nov;84(5):2020-7. PubMed PMID: 1934376.
133. Matsuda M, DeFronzo RA, Glass L, Consoli A, Giordano M, Bressler P, et al. Glucagon dose-response curve for hepatic glucose production and glucose disposal in type 2 diabetic patients and normal individuals. *Metabolism*. 2002 Sep;51(9):1111-9. PubMed PMID: 12200754.
134. Mattson MP. Energy intake, meal frequency, and health: a neurobiological perspective. *Annual review of nutrition*. 2005;25:237-60. PubMed PMID: 16011467.
135. Mattson MP. The need for controlled studies of the effects of meal frequency on health. *Lancet*. 2005 Jun 4-10;365(9475):1978-80. PubMed PMID: 15936428.
136. Mauvais-Jarvis F. Sex differences in metabolic homeostasis, diabetes, and obesity. *Biology of sex differences*. 2015;6:14. PubMed PMID: 26339468. Pubmed Central PMCID: 4559072.
137. Mazze RS, Strock E, Wesley D, Borgman S, Morgan B, Bergenstal R, et al. Characterizing glucose exposure for individuals with normal glucose tolerance using continuous glucose monitoring and ambulatory glucose profile analysis. *Diabetes technology & therapeutics*. 2008 Jun;10(3):149-59. PubMed PMID: 18473688.
138. McClean PL, Irwin N, Cassidy RS, Holst JJ, Gault VA, Flatt PR. GIP receptor antagonism reverses obesity, insulin resistance, and associated metabolic disturbances induced in mice by prolonged consumption of high-fat diet. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2007 Dec;293(6):E1746-55. PubMed PMID: 17848629.
139. Meier JJ. The contribution of incretin hormones to the pathogenesis of type 2 diabetes. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2009 Aug;23(4):433-41. PubMed PMID: 19748061.
140. Mekary RA, Giovannucci E, Cahill L, Willett WC, van Dam RM, Hu FB. Eating patterns and type 2 diabetes risk in older women: breakfast consumption and eating frequency. *The American journal of clinical nutrition*. 2013 Aug;98(2):436-43. PubMed PMID: 23761483. Pubmed Central PMCID: 3712552.
141. Mekary RA, Giovannucci E, Willett WC, van Dam RM, Hu FB. Eating patterns and type 2 diabetes risk in men: breakfast omission, eating frequency, and snacking. *The American journal of clinical nutrition*. 2012 May;95(5):1182-9. PubMed PMID: 22456660. Pubmed Central PMCID: 3325839.
142. Mishra AK, Dubey V, Ghosh AR. Obesity: An overview of possible role(s) of gut hormones, lipid sensing and gut microbiota. *Metabolism*. 2016 Jan;65(1):48-65. PubMed PMID: 26683796.
143. Monnier L. Is postprandial glucose a neglected cardiovascular risk factor in type 2 diabetes? *European journal of clinical investigation*. 2000 Aug;30 Suppl 2:3-11. PubMed PMID: 10975048.
144. Monnier L, Colette C, Dunseath GJ, Owens DR. The loss of postprandial glycemic control precedes stepwise deterioration of fasting with worsening diabetes. *Diabetes care*. 2007 Feb;30(2):263-9. PubMed PMID: 17259492.
145. Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol JP, et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *Jama*. 2006 Apr 12;295(14):1681-7. PubMed PMID: 16609090.
146. Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *The Journal of biological chemistry*. 2001 Aug 10;276(32):30392-8. PubMed PMID: 11402048.
147. Moran LJ, Luscombe-Marsh ND, Noakes M, Wittert GA, Keogh JB, Clifton PM. The satiating effect of dietary protein is unrelated to postprandial ghrelin secretion. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005 Sep;90(9):5205-11. PubMed PMID: 16014402.

148. Munsters MJ, Saris WH. Effects of meal frequency on metabolic profiles and substrate partitioning in lean healthy males. *PloS one*. 2012;7(6):e38632. PubMed PMID: 22719910. Pubmed Central PMCID: 3374835.
149. Nauck M, Stockmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*. 1986 Jan;29(1):46-52. PubMed PMID: 3514343.
150. Nauck MA, Homberger E, Siegel EG, Allen RC, Eaton RP, Ebert R, et al. Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1986 Aug;63(2):492-8. PubMed PMID: 3522621.
151. Nicklas BJ, Katzell LI, Ryan AS, Dennis KE, Goldberg AP. Gender differences in the response of plasma leptin concentrations to weight loss in obese older individuals. *Obesity research*. 1997 Jan;5(1):62-8. PubMed PMID: 9061717.
152. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000 Apr 13;404(6779):787-90. PubMed PMID: 10783895.
153. Nuttall FQ, Gannon MC, Wald JL, Ahmed M. Plasma glucose and insulin profiles in normal subjects ingesting diets of varying carbohydrate, fat, and protein content. *Journal of the American College of Nutrition*. 1985;4(4):437-50. PubMed PMID: 3900180.
154. Ohkawara K, Cornier MA, Kohrt WM, Melanson EL. Effects of increased meal frequency on fat oxidation and perceived hunger. *Obesity*. 2013 Feb;21(2):336-43. PubMed PMID: 23404961. Pubmed Central PMCID: 4391809.
155. Padh H, Subramoniam A, Aleo JJ. Glucose inhibits cellular ascorbic acid uptake by fibroblasts in vitro. *Cell biology international reports*. 1985 Jun;9(6):531-8. PubMed PMID: 4028183.
156. Pal S, Ellis V. The acute effects of four protein meals on insulin, glucose, appetite and energy intake in lean men. *The British journal of nutrition*. 2010 Oct;104(8):1241-8. PubMed PMID: 20456814.
157. Pedersen CR, Hagemann I, Bock T, Buschard K. Intermittent feeding and fasting reduces diabetes incidence in BB rats. *Autoimmunity*. 1999;30(4):243-50. PubMed PMID: 10524500.
158. Pelikanova T. [Insulin resistance - its causes and therapy possibilities]. *Vnitřní lékařství*. 2014 Sep;60(9):746-55. PubMed PMID: 25294764. Insulinová rezistence - příčiny a možnosti ovlivnění.
159. Pelikánová T. Patogeneze a průběh diabetu 2. typu. In: *Praktická diabetologie, 5. aktualizované vydání*. p. 88-1022011.
160. Pelikanova T, Kazdova L, Chvojková S, Base J. Serum phospholipid fatty acid composition and insulin action in type 2 diabetic patients. *Metabolism*. 2001 Dec;50(12):1472-8. PubMed PMID: 11735096.
161. Pelikanova T, Kohout M, Valek J, Base J, Kazdova L. Insulin secretion and insulin action related to the serum phospholipid fatty acid pattern in healthy men. *Metabolism*. 1989 Feb;38(2):188-92. PubMed PMID: 2643754.
162. Pendergrass M, Bertoldo A, Bonadonna R, Nucci G, Mandarino L, Cobelli C, et al. Muscle glucose transport and phosphorylation in type 2 diabetic, obese nondiabetic, and genetically predisposed individuals. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2007 Jan;292(1):E92-100. PubMed PMID: 16896161.
163. Perello M, Scott MM, Sakata I, Lee CE, Chuang JC, Osborne-Lawrence S, et al. Functional implications of limited leptin receptor and ghrelin receptor coexpression in the brain. *The Journal of comparative neurology*. 2012 Feb 1;520(2):281-94. PubMed PMID: 21674492. Pubmed Central PMCID: 3282302.
164. Perez-Martinez P, Garcia-Quintana JM, Yubero-Serrano EM, Tasset-Cuevas I, Tunez I, Garcia-Rios A, et al. Postprandial oxidative stress is modified by dietary fat: evidence from a human intervention study. *Clinical science*. 2010 Jun 15;119(6):251-61. PubMed PMID: 20420579.
165. Perry B, Wang Y. Appetite regulation and weight control: the role of gut hormones. *Nutrition & diabetes*. 2012;2:e26. PubMed PMID: 23154682. Pubmed Central PMCID: 3302146.
166. Peters AL, Davidson MB. Protein and fat effects on glucose responses and insulin requirements in subjects with insulin-dependent diabetes mellitus. *The American journal of clinical nutrition*. 1993 Oct;58(4):555-60. PubMed PMID: 8379513.
167. Poirout V. Lipotoxicity impairs incretin signalling. *Diabetologia*. 2013 Feb;56(2):231-3. PubMed PMID: 23188391. Pubmed Central PMCID: 3537857.
168. Polonsky KS, Given BD, Hirsch LJ, Tillil H, Shapiro ET, Beebe C, et al. Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England journal of medicine*. 1988 May 12;318(19):1231-9. PubMed PMID: 3283554.
169. Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *The Journal of clinical investigation*. 2006 Jul;116(7):1802-12. PubMed PMID: 16823478. Pubmed Central PMCID: 1483155.
170. Purnell JQ, Cummings D, Weigle DS. Changes in 24-h area-under-the-curve ghrelin values following diet-induced weight loss are associated with loss of fat-free mass, but not with changes in fat mass, insulin levels or insulin sensitivity. *International journal of obesity*. 2007 Feb;31(2):385-9. PubMed PMID: 16819531.

171. Purslow LR, Sandhu MS, Forouhi N, Young EH, Luben RN, Welch AA, et al. Energy intake at breakfast and weight change: prospective study of 6,764 middle-aged men and women. *American journal of epidemiology*. 2008 Jan 15;167(2):188-92. PubMed PMID: 18079134.
172. Raynor HA, Goff MR, Poole SA, Chen G. Eating Frequency, Food Intake, and Weight: A Systematic Review of Human and Animal Experimental Studies. *Frontiers in nutrition*. 2015;2:38. PubMed PMID: 26734613. Pubmed Central PMCID: 4683169.
173. Reinehr T, de Sousa G, Roth CL. Fasting glucagon-like peptide-1 and its relation to insulin in obese children before and after weight loss. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2007 May;44(5):608-12. PubMed PMID: 17460495.
174. Reutrakul S, Hood MM, Crowley SJ, Morgan MK, Teodori M, Knutson KL. The relationship between breakfast skipping, chronotype, and glycemic control in type 2 diabetes. *Chronobiology international*. 2014 Feb;31(1):64-71. PubMed PMID: 24094031.
175. Rijkkelijkhuizen JM, McQuarrie K, Girman CJ, Stein PP, Mari A, Holst JJ, et al. Effects of meal size and composition on incretin, alpha-cell, and beta-cell responses. *Metabolism*. 2010 Apr;59(4):502-11. PubMed PMID: 19846181.
176. Riserus U. Fatty acids and insulin sensitivity. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2008 Mar;11(2):100-5. PubMed PMID: 18301083.
177. Riserus U, Willett WC, Hu FB. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Progress in lipid research*. 2009 Jan;48(1):44-51. PubMed PMID: 19032965. Pubmed Central PMCID: 2654180.
178. Roth JD, Roland BL, Cole RL, Trevaskis JL, Weyer C, Koda JE, et al. Leptin responsiveness restored by amylin agonism in diet-induced obesity: evidence from nonclinical and clinical studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008 May 20;105(20):7257-62. PubMed PMID: 18458326. Pubmed Central PMCID: 2438237.
179. Runchey SS, Valsta LM, Schwarz Y, Wang C, Song X, Lampe JW, et al. Effect of low- and high-glycemic load on circulating incretins in a randomized clinical trial. *Metabolism*. 2013 Feb;62(2):188-95. PubMed PMID: 22959497. Pubmed Central PMCID: 3519963.
180. Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiological reviews*. 2007 Apr;87(2):507-20. PubMed PMID: 17429039. Pubmed Central PMCID: 2995548.
181. Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijarvi A, et al. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002 Jul;87(7):3023-8. PubMed PMID: 12107194.
182. Shaw JE, Hodge AM, de Courten M, Chitson P, Zimmet PZ. Isolated post-challenge hyperglycaemia confirmed as a risk factor for mortality. *Diabetologia*. 1999 Sep;42(9):1050-4. PubMed PMID: 10447514.
183. Sherman H, Genzer Y, Cohen R, Chapnik N, Madar Z, Froy O. Timed high-fat diet resets circadian metabolism and prevents obesity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2012 Aug;26(8):3493-502. PubMed PMID: 22593546.
184. Shulman GI, Rothman DL, Jue T, Stein P, DeFronzo RA, Shulman RG. Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *The New England journal of medicine*. 1990 Jan 25;322(4):223-8. PubMed PMID: 2403659.
185. Scharf MT, Ahima RS. Gut peptides and other regulators in obesity. *Seminars in liver disease*. 2004 Nov;24(4):335-47. PubMed PMID: 15605302.
186. Scheer FA, Morris CJ, Shea SA. The internal circadian clock increases hunger and appetite in the evening independent of food intake and other behaviors. *Obesity*. 2013 Mar;21(3):421-3. PubMed PMID: 23456944. Pubmed Central PMCID: 3655529.
187. Schindler K, Prager G, Ballaban T, Kretschmer S, Riener R, Buranyi B, et al. Impact of laparoscopic adjustable gastric banding on plasma ghrelin, eating behaviour and body weight. *European journal of clinical investigation*. 2004 Aug;34(8):549-54. PubMed PMID: 15305889.
188. Skrha J. [Pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes in 2011--the unifying model of glucoregulation disorder]. *Vnitřní lékařství*. 2011 Nov;57(11):949-53. PubMed PMID: 22165702. Patogeneze diabetes mellitus 1. a 2. typu v roce 2011--jednotlivý model poruchy glykoregulace.
189. Skrha J, Hilgertová J, Jarolímková M, Kunesová M, Hill M. Meal test for glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) in obese and type 2 diabetic patients. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2010;59(5):749-55. PubMed PMID: 20406045.
190. Sluijs I, Beulens JW, van der AD, Spijkerman AM, Grobbee DE, van der Schouw YT. Dietary intake of total, animal, and vegetable protein and risk of type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-NL study. *Diabetes care*. 2010 Jan;33(1):43-8. PubMed PMID: 19825820. Pubmed Central PMCID: 2797984.

191. Stefan N, Kantartzis K, Celebi N, Staiger H, Machann J, Schick F, et al. Circulating palmitoleate strongly and independently predicts insulin sensitivity in humans. *Diabetes care*. 2010 Feb;33(2):405-7. PubMed PMID: 19889804. Pubmed Central PMCID: 2809292.
192. Stock S, Leichter P, Wong AC, Ghatei MA, Kieffer TJ, Bloom SR, et al. Ghrelin, peptide YY, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, and hunger responses to a mixed meal in anorexic, obese, and control female adolescents. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005 Apr;90(4):2161-8. PubMed PMID: 15657373.
193. Storlien LH, Pan DA, Kriketos AD, O'Connor J, Caterson ID, Cooney GJ, et al. Skeletal muscle membrane lipids and insulin resistance. *Lipids*. 1996 Mar;31 Suppl:S261-5. PubMed PMID: 8729130.
194. Škrha J. Oxidative stress and its relationship to diabetes complications. *Interní Med*. 2010;12(9):414-8. Oxidační stres a jeho vztah ke komplikacím diabetu.
195. Tai MM, Castillo P, Pi-Sunyer FX. Meal size and frequency: effect on the thermic effect of food. *The American journal of clinical nutrition*. 1991 Nov;54(5):783-7. PubMed PMID: 1951147.
196. Tolhurst G, Reimann F, Gribble FM. Intestinal sensing of nutrients. *Handbook of experimental pharmacology*. 2012 (209):309-35. PubMed PMID: 22249821.
197. UKPDS. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998 Sep 12;352(9131):837-53. PubMed PMID: 9742976.
198. van der Heijden AA, Hu FB, Rimm EB, van Dam RM. A prospective study of breakfast consumption and weight gain among U.S. men. *Obesity*. 2007 Oct;15(10):2463-9. PubMed PMID: 17925472.
199. Vang A, Singh PN, Lee JW, Haddad EH, Brinegar CH. Meats, processed meats, obesity, weight gain and occurrence of diabetes among adults: findings from Adventist Health Studies. *Annals of nutrition & metabolism*. 2008;52(2):96-104. PubMed PMID: 18349528.
200. Vessby B, Aro A, Skarfors E, Berglund L, Salminen I, Lithell H. The risk to develop NIDDM is related to the fatty acid composition of the serum cholesterol esters. *Diabetes*. 1994 Nov;43(11):1353-7. PubMed PMID: 7926311.
201. Vessby B, Gustafsson IB, Tengblad S, Boberg M, Andersson A. Desaturation and elongation of Fatty acids and insulin action. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002 Jun;967:183-95. PubMed PMID: 12079847.
202. Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ. Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2001 Mar;50(3):609-13. PubMed PMID: 11246881.
203. Visscher TL, Seidell JC. The public health impact of obesity. *Annual review of public health*. 2001;22:355-75. PubMed PMID: 11274526.
204. Vollmer K, Holst JJ, Baller B, Ellrichmann M, Nauck MA, Schmidt WE, et al. Predictors of incretin concentrations in subjects with normal, impaired, and diabetic glucose tolerance. *Diabetes*. 2008 Mar;57(3):678-87. PubMed PMID: 18057091.
205. Wagenknecht M, Hainer V, Kunesova M, Bellisle F, Parizkova J, Braunerova R, et al. [Relationships between the "eating inventory" factors, socioeconomic status, anthropometric body adiposity indexes and health risks in Czech population]. *Casopis lekaru ceskych*. 2007;146(3):284-6, 7-91. PubMed PMID: 17419315. Vztahy mezi faktory "dotazniku jidelnich zvyklosti", socioekonomickym stavem, antropometrickymi ukazateli akumulace tuku a zdravotnimi riziky u ceske populace.
206. Wang ZQ, Bell-Farrow AD, Sonntag W, Cefalu WT. Effect of age and caloric restriction on insulin receptor binding and glucose transporter levels in aging rats. *Experimental gerontology*. 1997 Nov-Dec;32(6):671-84. PubMed PMID: 9785093.
207. Warnotte C, Gilon P, Nenquin M, Henquin JC. Mechanisms of the stimulation of insulin release by saturated fatty acids. A study of palmitate effects in mouse beta-cells. *Diabetes*. 1994 May;43(5):703-11. PubMed PMID: 8168648.
208. Wauters M, Considine RV, Yudkin JS, Peiffer F, De Leeuw I, Van Gaal LF. Leptin levels in type 2 diabetes: associations with measures of insulin resistance and insulin secretion. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2003 Feb;35(2):92-6. PubMed PMID: 12734788.
209. Weidig P, McMaster D, Bayraktutan U. High glucose mediates pro-oxidant and antioxidant enzyme activities in coronary endothelial cells. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2004 Nov;6(6):432-41. PubMed PMID: 15479219.
210. Weiss EP, Albert SG, Reeds DN, Kress KS, Ezekiel UR, McDaniel JL, et al. Calorie Restriction and Matched Weight Loss From Exercise: Independent and Additive Effects on Glucoregulation and the Incretin System in Overweight Women and Men. *Diabetes care*. 2015 Jul;38(7):1253-62. PubMed PMID: 25877812. Pubmed Central PMCID: 4477336.

211. Woerle HJ, Carneiro L, Derani A, Goke B, Schirra J. The role of endogenous incretin secretion as amplifier of glucose-stimulated insulin secretion in healthy subjects and patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2012 Sep;61(9):2349-58. PubMed PMID: 22721966. Pubmed Central PMCID: 3425423.
212. Wolpert HA, Atakov-Castillo A, Smith SA, Steil GM. Dietary fat acutely increases glucose concentrations and insulin requirements in patients with type 1 diabetes: implications for carbohydrate-based bolus dose calculation and intensive diabetes management. *Diabetes care*. 2013 Apr;36(4):810-6. PubMed PMID: 23193216. Pubmed Central PMCID: 3609492.
213. Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, et al. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*. 2000 Nov;141(11):4325-8. PubMed PMID: 11089570.
214. Yokode M, Kita T, Kikawa Y, Ogorochi T, Narumiya S, Kawai C. Stimulated arachidonate metabolism during foam cell transformation of mouse peritoneal macrophages with oxidized low density lipoprotein. *The Journal of clinical investigation*. 1988 Mar;81(3):720-9. PubMed PMID: 3125226. Pubmed Central PMCID: 442519.
215. Young A. Inhibition of food intake. *Advances in pharmacology*. 2005;52:79-98. PubMed PMID: 16492542.

10. Seznam příloh

Příloha 1

BELINOVA, L., KAHLEOVA, H., MALINSKA, H., TOPOLCAN, O., VRZALOVA, J., OLIYARNYK, O., KAZDOVA, L., HILL, M., PELIKANNOVA, T. Differential acute postprandial effects of processed meat and isocaloric vegan meals on the gastrointestinal hormone response in subjects suffering from type 2 diabetes and healthy controls. A randomized crossover study. PLoS One. 2014 Sep 15;9(9). **IF 4,17**

Příloha 2

MALINSKA, H., KAHLEOVA, H., TOPOLCAN, O., VRZALOVA, J., OLIYARNYK, O., KAZDOVA, L., BELINOVA, L., HILL, M., PELIKANNOVA, T. Postprandial oxidative stress and gastrointestinal hormones: is there a link? PLoS One. 2014 Aug 20; 9(8). **IF 4,17**

Příloha 3

KAHLEOVA, H., BELINOVA, L., MALINSKA, H., OLIYARNYK, O., TRNOVSKA, J., SKOP, V., KAZDOVA, L., DEZORTOVA, M., HAJEK, M., HILL, M., PELIKANNOVA, T. Eating two larger meals a day (breakfast and lunch) is more effective than six smaller meals in a reduced-energy regimen for patients with type 2 diabetes: a randomised crossover study. Diabetologia. 2014 Aug; 57(8). **IF 6,67**

Příloha 4

BELINOVA, L., KAHLEOVA, H., MALINSKA, H., TOPOLCAN, O., VRZALOVA, J., OLIYARNYK, O., KAZDOVA, L., HILL, M., PELIKANNOVA, T. The effect of meal frequency in a reduced-energy regimen on the gastrointestinal and appetite hormones in patients with type 2 diabetes: a randomised crossover study. PLoS One. 2017 Apr 3;12(4). **IF 3,54**

Příloha 5

KAHLEOVA H, BELINOVA L, HILL M, PELIKANNOVA T. Do patients with type 2 diabetes still need to eat snacks? Eur J Clin Nutr. 2015 Jun;69(6). **IF 2,709**

Příloha 6

KAHLEOVA H, MALINSKA H, KAZDOVA L, BELINOVA L, TURA A, HILL M, PELIKANNOVA T. The Effect of Meal Frequency on the Fatty Acid Composition of Serum Phospholipids in Patients with Type 2 Diabetes. J Am Coll Nutr. 2016 May-Jun;35(4). **IF 2,245**